

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“ZO-2 favorece la señalización de la vía Hippo y su re-
expresión por la activación de la AMPK restaura el sellado
de las uniones estrechas en el hígado con esteatosis”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Laura González González

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en la Especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Directora de la tesis

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

México, Ciudad de México

Febrero, 2022

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel profesora titular del laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becaria de CONACYT No. 340209).

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”.

(Isaac Newton)

Agradecimientos

A la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel por aceptarme como parte de su equipo de laboratorio. Su pasión y disciplina al hacer ciencia me inspiran a poner mi mayor esfuerzo cada día. Gracias por creer en mí y siempre alentarme a romper mis límites.

A la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz, el Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño y el Dr. José Everardo Avelino Cruz por el apoyo, las sugerencias y la dedicación durante el desarrollo de este trabajo.

A la QFB. María de Lourdes Alarcón Mortera por apoyarme durante el aprendizaje de las técnicas de laboratorio y a la M. en C. Dolores Martín Tapia por su invaluable trabajo en el manejo de los modelos animales utilizados en esta tesis. Al Biol. Miguel Ángel Rojas Sierra por brindarme siempre a tiempo y en perfectas condiciones el material para mi trabajo. A Alicia Teudosio Díaz por su ayudarme a conseguir mis reactivos a tiempo.

A mis compañeros del laboratorio 29: Arturo, Mario (D.E.P), Elida, Jael, Christian, Misael, Helios, Cristina, Balduino, Sara y Diego. Gracias por su apoyo y amistad durante estos años. Formamos un gran equipo.

A mis padres

M.I.A Godofredo González Fuentes y Carmina González Rodríguez, gracias por apoyarme incondicionalmente, tenerme paciencia infinita y educarme con tanto amor. Los amo profundamente y todo lo que soy es gracias a ustedes.

A mis hermanos y sobrino

Dr. Alberto González, eres un gran ejemplo de hermano mayor y profesionalista, gracias por toda la confianza que pones en mí, tu apoyo me hace fuerte.

Andrea González, gracias por ser mi cómplice en todo, hacerme sonreír todos los días y cuidarme tanto.

Francisco Xavier, por alegrar mi vida con su llegada.

A mi novio

Dr. Helios Alfredo Gallego Gutiérrez, gracias por ser mi soporte en la adversidad. Por quererme, cuidarme tanto y por estar dispuesto a escuchar todo el día sobre mi trabajo.

A Lulú

Gracias infinitas por darme tu amistad y cariño durante todos estos años. Por todo el apoyo en los momentos difíciles.

A Lolita, Mike y Alice

Por la confianza, las risas, los detalles y los buenos momentos que pasamos en el laboratorio. Su apoyo y amistad me hicieron sentirme en casa.

A mis tíos y primos

Por todas las muestras de cariño y los buenos momentos. En especial a mi tío Juan Hernández, por que cumplió su promesa.

A mis amigos

Por ser mi segunda familia y ayudarme a ser mejor persona. Alejandro Herrera, Saúl León y Eduardo Sánchez.

Índice

Lista de abreviaturas.....	4
Resumen	6
Abstract.....	7
I) Introducción	8
1.1) Los epitelios.....	8
1.2) Las uniones estrechas.....	8
1.3) ZO-2	10
1.3.1) Organización molecular de ZO-2	10
1.3.2) Localización y tráfico intracelular de ZO-2	11
1.3.3) Regulación transcripcional de ZO-2.....	13
1.3.4) Función de ZO-2	13
a) Función de ZO-2 en la membrana	14
b) Función de ZO-2 en el núcleo.....	14
1.4) Regulación del tamaño celular	16
1.4.1) Vía Hippo	16
1.4.2) Ruta mTOR.....	18
1.5) Papel de ZO-2 en la regulación del tamaño celular.....	19
1.5.1) El complejo APC/SAV/LATS y su relación con la activación de AKT y el silenciamiento de ZO-2.....	20
1.6) Hipertrofia	22
1.7) Hipertrofia renal y ZO-2.....	22
1.8) Esteatosis hepática.....	22
1.9) Las UE en el hígado.....	23
1.10) ZO-2 y su relación con la colestasis intrahepática	25

1.11) La rata Zucker obesa como modelo de esteatosis hepática	27
II) Planteamiento del problema.....	28
III) Objetivo general	28
IV) Hipótesis.....	28
V Metodología	29
5.1) Cultivo celular	29
5.2) Inmunoprecipitación de ZO-2 y LATS	29
5.3) Ensayo de arrastre de proteínas	30
5.4) Inmunofluorescencia de las células MDCK.....	30
5.5) Inmunodetección de proteínas (Western blot)	31
5.6) Protocolo para inducir la formación de las UE en las células epiteliales	32
5.7) Uninefrectomía (UNX).....	32
5.8) Extracción del ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR)	33
5.9) Fraccionamiento nuclear derivado de riñón	34
5.10) Análisis de miARNs mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR).....	35
5.11) Ratas Zucker diabéticas obesas.....	36
5.12) Inmunofluorescencias en hígado	37
5.13) Ensayo de flujo de LC3-II	38
5.14) Tratamiento de las ratas ZDF obesas con metformina	38
5.15) Cuantificación de ácidos biliares totales	39
5.16) Permeabilidad del hígado al lantano determinada por microscopía electrónica...	40
VI) Resultados	41

6.1) ZO-2 se asocia con la cinasa LATS y favorece su concentración en el borde celular.	41
6.2. La expresión de ZO-2 se regula a nivel transcripcional por Sp1 en las células renales.	45
6.3) El silenciamiento de ZO-2 en el riñón después de una UNX no se regula por los miARNs 23a, 23b, 124 o 137.....	49
6.4) En los hepatocitos de la rata Zucker obesa la expresión de ZO-2 disminuye y YAP se concentra en el núcleo.	50
6.5) La esteatosis en el hígado de las ratas OZ correlaciona con una alteración de la actividad del autolisosoma.	53
6.6) En el hígado de las ratas OZ, la activación de la AMPK con metformina aumenta la expresión de ZO-2 y pLATS y disminuye la concentración nuclear de YAP.....	55
6.7) En las ratas OZ el tratamiento con metformina restaura la expresión de la claudina- 1, disminuye la permeabilidad paracelular de los hepatocitos y el contenido de sales biliares en el suero.....	56
6.8) El tratamiento con metformina revierte la disfunción de la BBiB a través de la inhibición de JNK.	61
VII) Discusión	64
VIII) Bibliografía	69

Lista de abreviaturas

ABR: Región de unión a actina

BBiB: Barrera hemato-biliar

BC: Medio con bajo calcio (1-5 μM Ca^{2+})

CIE: Colestasis intrahepática del embarazo

CIFP: Colestasis intrahepática familiar progresiva

CN: Medio con calcio normal (1.8 mM Ca^{2+})

GK: Guanilato cinasa

HCF: Hipercolanemia familiar

HRC: Hipertrofia renal compensatoria

LATS: Acrónimo de large tumor suppresor

LZ: Rata Zucker delgada

MAGI: MAGUK invertida

MAGUK: Proteína asociada a membrana con homología a la cinasa de guanilato

MET: metformina

MST : Acrónimo de mammalian Ste2-like

MTM: mitramicina

mTOR: Acrónimo de mechanistic target of rapamycin

NES: Señal de exportación nuclear

NLS: Señal de localización nuclear

OZ: rata Zucker obesa

S6K1: Cinasa S6

SAV: proteína Salvador

UA: Unión adherente

UA: Unión adherente

UE: Unión estrecha

UE: Unión estrecha

UNX: Uninefrectomía

YAP: Proteína asociada a Yes

ZO: Zonula occludens

Resumen

Zonula occludens 2 (ZO-2) es una proteína plataforma que conecta a las proteínas integrales de la unión estrecha (UE) con el citoesqueleto de actina y tiene un papel crucial en la polimerización de las claudinas en los filamentos de las UEs. ZO-2 además participa en la regulación del tamaño celular. Así, el silenciamiento de ZO-2 en las células MDCK induce hipertrofia por acumulación nuclear de YAP, la proteína efectora de la vía Hippo. En la hipertrofia renal compensatoria (HRC) inducida en ratas por uninefrectomía, la expresión de ZO-2 se silencia y YAP se acumula en el núcleo. Con base en estos antecedentes, en esta tesis se investigó que causa la acumulación de YAP en el núcleo cuando ZO-2 está ausente y si el silenciamiento de ZO-2 es una característica común en los órganos hipertróficos. Encontramos que en tres modelos de hipertrofia: las células MDCK ZO-2 KD, la HRC y el hígado con esteatosis de la rata Zucker obesa (OZ), el silenciamiento de ZO-2 se acompaña de una disminución en la activación de LATS, la cinasa de la ruta Hippo que fosforila a YAP. Demostramos que ZO-2 interactúa con LATS1 y funciona como plataforma que promueve la señalización de la vía Hippo y evita la acumulación nuclear de YAP. En el riñón hipertrófico y en el hígado con esteatosis el silenciamiento de ZO-2 se debe a la disminución del factor de transcripción Sp1 y del ARNm de ZO-2. En el hígado de la rata OZ, la activación de la AMPK con metformina restaura la expresión de ZO-2 y claudina 1, reduce la permeabilidad de los canalículos biliares y la concentración de ácidos biliares en el suero. Este proceso involucra la inhibición de la cinasa JNK que promueve el desensamble de las UEs. Nuestras observaciones en el hígado con esteatosis resaltan la importancia de la re-expresión de ZO-2 por la AMPK para mantener la barrera hematobiliar y sugieren que ZO-2 es un blanco terapéutico para el tratamiento de la colestasis intrahepática.

Abstract

Zonula occludens 2 (ZO-2) is a scaffold protein that links integral tight junctions (TJs) proteins to the actin cytoskeleton and is crucial for the polymerization of claudins into TJ strands. Moreover, ZO-2 participates in cell size regulation. Thus, ZO-2 silencing in renal epithelial MDCK cells induces hypertrophy by the nuclear accumulation of Yes-associated protein (YAP), the final target of the Hippo pathway. In renal compensatory hypertrophy (RCH) generated in rats after an unilateral nephrectomy (UNX), the expression of ZO-2 diminished while YAP concentrated at the nucleus. Based on these information, the aim of this thesis has been to study what causes the accumulation of YAP at the nucleus when ZO-2 is absent and if ZO-2 silencing is a common feature observed in organ hypertrophy. We found that in three models of hypertrophy: MDCK ZO-2 KD cells, RCH in rats, and the steatotic liver of obese Zucker (OZ) rats, ZO-2 silencing is accompanied by a decrease expression of active LATS1, the kinase that phosphorylates YAP in the Hippo pathway. Our results show that ZO-2 interacts with LATS1 and prevents the nuclear accumulation of YAP by activating the Hippo pathway. ZO-2 silencing in hypertrophic kidneys and steatotic liver is due to a decrease in transcription factor Sp1 and ZO-2 mRNA. In the liver of OZ rats, activation of AMPK with metformin restores ZO-2 and claudin-1 expression, reduces paracellular permeability of canaliculi, and total bile acid concentration in serum. This process involves the inhibition of JNK signaling, which triggers junction disassembly. Our observations in steatotic liver highlight the importance of the re-expression of ZO-2 by AMPK for the maintenance of the hematobiliary barrier and suggest that ZO-2 is a therapeutic target for the treatment of intrahepatic cholestasis.

I) Introducción

1.1) Los epitelios

En los organismos multicelulares, los epitelios cubren al cuerpo, las cavidades y los ductos y constituyen la barrera entre el individuo y el medio externo. Su función es proteger al organismo de microorganismos, toxinas y trauma mecánico, evitar la evaporación de agua y regular el intercambio de sustancias entre el contenido de las cavidades y ductos con los tejidos subyacentes. En las áreas con alto estrés mecánico o químico como la piel, el esófago, la córnea y la vagina, los epitelios son estratificados, mientras que en el resto del cuerpo se organizan en monocapas (González-Mariscal et al., 2012) .

Las células epiteliales polarizan su membrana en dos regiones: apical y basolateral. En el límite apico-lateral se localiza el complejo de unión apical constituido por la unión adherente (UA) y la unión estrecha (UE). La UA establece los contactos iniciales célula-célula, mientras que la UE regula el tránsito de iones, moléculas y células a través de la ruta paracelular (Fanning and Anderson, 2009).

1.2) Las uniones estrechas

Las UEs son estructuras de contacto célula-célula que se localizan en la porción superior de la membrana lateral, por encima de la UA. Mediante microscopía electrónica de transmisión, la UE se observa como un conjunto de puntos donde las membranas exoplásmicas de las células adyacentes parecen fusionarse (Farquhar and Palade, 1963). Por criofractura la UE se observa como una red de filamentos que rodea a las células por debajo de las microvellosidades apicales (Claude and Goodenough, 1973). Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE rodean el borde celular en un patrón que asemeja a una malla de gallinero (Stevenson et al., 1988).

Las UEs tienen dos funciones canónicas: de compuerta y cerca. La función de compuerta regula el paso de iones, moléculas y agua a través de la vía paracelular, y la de cerca restringe el movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana, entre los dominios apical y basal. Esta última función mantiene la polaridad de la membrana

plasmática, lo que permite el tránsito vectorial de moléculas y iones a través de los epitelios (Dragsten et al., 1981; van Meer and Simons, 1986).

Las UEs están constituidas por un complejo grupo de moléculas que incluye a proteínas integrales y periféricas. Las primeras establecen las interacciones que cierran el espacio intercelular y son responsables de la selectividad iónica paracelular. Existen dos clases de proteínas integrales en la UE: las de cuatro dominios transmembranales o tetraspan y las de sólo uno. Las tetraspan incluyen a las claudinas, y a la familia TAMP que agrupa a ocludina, tricelulina y MarvelD3. Las que cruzan una sola vez la membrana son las JAM y las angulinas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas proteínas no forman a los filamentos de la UE, pero son las primeras en arribar a los sitios donde se establecen las UE, por lo que se les considera marcadoras de sitio (González-Mariscal et al., 2012).

Las proteínas periféricas funcionan como un puente entre las proteínas integrales de la UE y el citoesqueleto de actina, y como plataforma citoplasmática que concentra en la UE a una gran variedad de proteínas de señalización. La función de plataforma obedece a que estas proteínas poseen múltiples dominios de unión proteína-proteína, como los módulos PDZ, que establecen interacciones homotípicas con otros dominios PDZ y asociaciones heterotípicas con motivos específicos presentes en el extremo carboxilo terminal de algunas proteínas. Otros dominios de interacción proteína-proteína que poseen las proteínas periféricas de la UE son los módulos SH3, guanilato cinasa (GK) y WW.

En la figura 1 se muestra a las proteínas de la UE con dominios PDZ, entre las que se encuentran los miembros de la familia MAGUK (membrane associated guanylate kinase homologue), ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals1, así como las MAGI (MAGUK invertidas), que a diferencia de las MAGUK tienen la mayoría de sus dominios PDZ orientados hacia la región carboxilo de la proteína y poseen en lugar de un dominio SH3 a un módulo WW. En la UE también se encuentran PATJ y MUPP1 que no pertenecen a las familias MAGUK o MAGI y se caracterizan por poseer 10 y 13 dominios PDZ respectivamente. Otras proteínas de la UE que no pertenecen a las familias antes mencionadas pero que tienen dominios PDZ son PAR-3, PAR-6 y AF-6 (González-Mariscal et al., 2012).

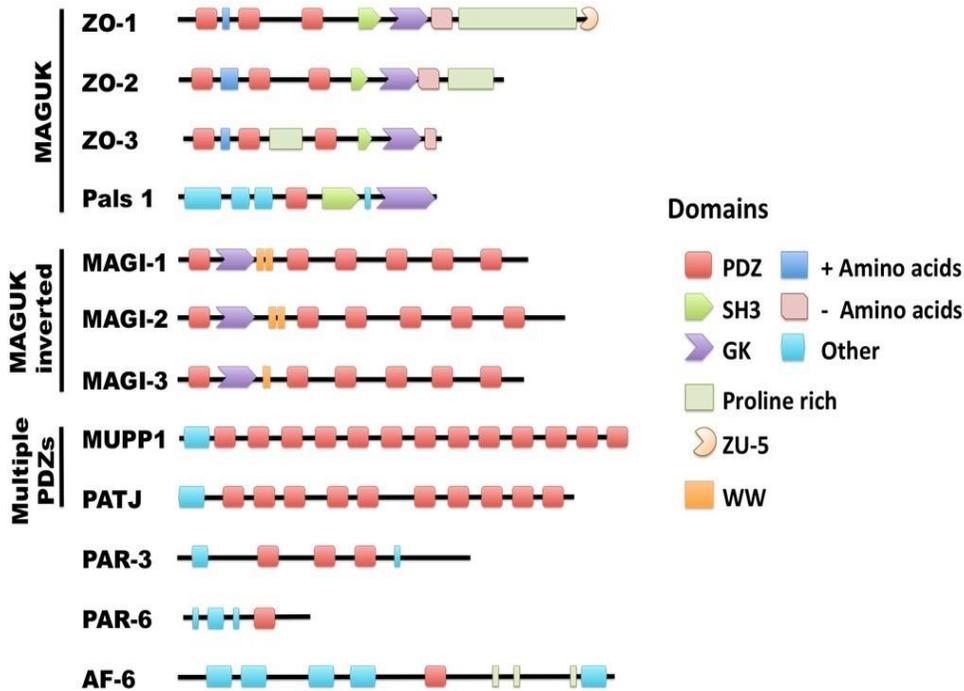


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas periféricas de la UE con dominios PDZ. Las proteínas pertenecientes a la familia MAGUK contienen dominios PDZ, SH3 y GK. Las proteínas MAGI tienen una organización invertida y en vez de dominios SH3 tienen módulos WW. En la UE también se localizan proteínas con múltiples dominios PDZ tales como MUPP1 y PATJ [Imagen tomada de (González-Mariscal et al., 2012)].

1.3) ZO-2

ZO-2 (*Zonula occludens 2*) es una proteína de 160 kDa que se identificó inicialmente porque co-inmunoprecipita con ZO-1 en extractos de células MDCK (Gumbiner et al., 1991).

1.3.1) Organización molecular de ZO-2

En la porción amino de ZO-2 se localizan los 3 dominios PDZ; en la sección media se encuentran los dominios SH3 y GuK que forman un supra módulo que se pliega como bisagra; y en la región carboxilo se ubica un dominio ácido y otro rico en prolinas, que en conjunto constituyen una región de unión a actina (ABR). En el extremo carboxilo terminal se encuentra un motivo TEL de unión a dominios PDZ.

ZO-2 funciona como una plataforma que mantiene unidas a múltiples proteínas en las UE. Así, el primer dominio PDZ se asocia con las claudinas; el segundo a ZO-1, a otras

moléculas de ZO-2, a conexina 43 y a las JAMs. La región SH3-GUK se asocia con la α catenina y la región ABR se une a actina y cingulina. El motivo TEL se asocia a la proteína Scribble, un miembro del complejo de polaridad lateral [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2017)] (figura 2).

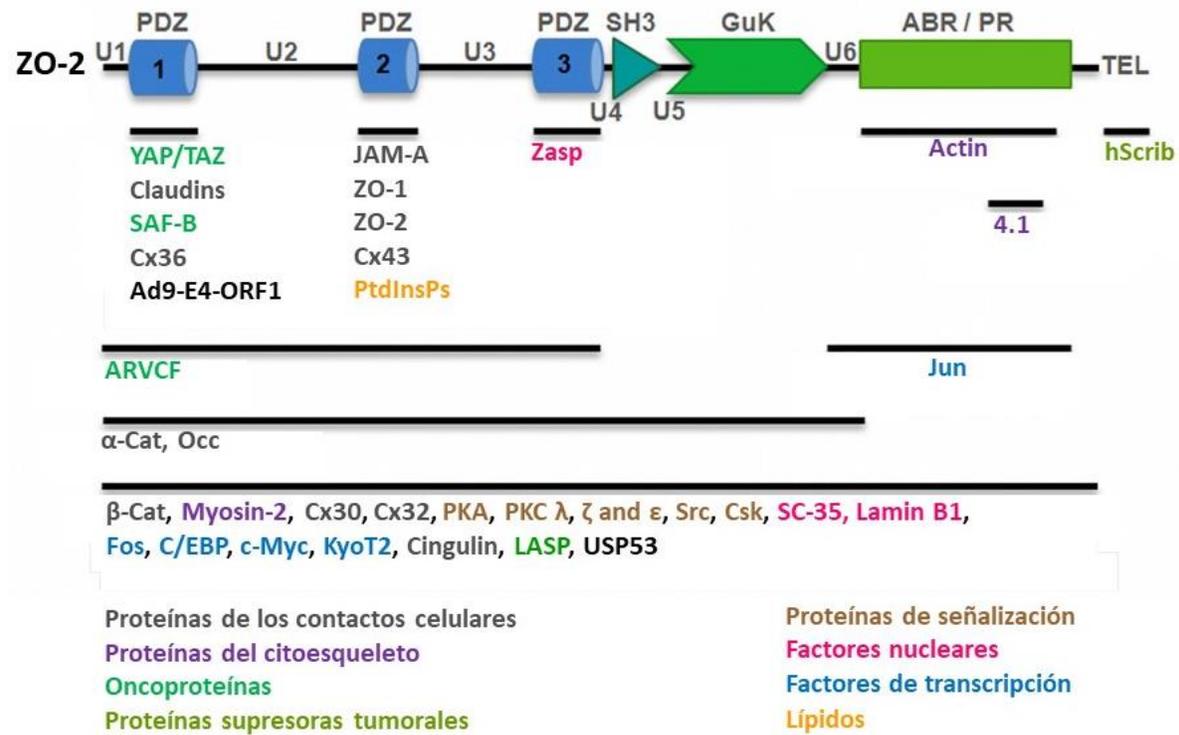


Figura 2. Representación esquemática de ZO-2 y las proteínas a las que se asocia. En la parte superior del esquema se encuentra el nombre de cada dominio de ZO-2. Las proteínas con las que ZO-2 se asocia, se localizan debajo de una línea que delimita el segmento con el que interactúan. En la parte inferior se indica, siguiendo el código de color, el tipo de proteínas involucrado [Imagen modificada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2016)].

1.3.2) Localización y tráfico intracelular de ZO-2

En las células epiteliales la distribución de ZO-2 cambia de acuerdo con el grado de confluencia del cultivo. Así, en los cultivos subconfluentes, ZO-2 además de estar presente en los bordes celulares como ocurre en los cultivos confluentes, también se localiza en el núcleo (Islas et al., 2002). ZO-2 entra al núcleo al final de la fase G1 y sale de este durante la fase M. Esto explica porque ZO-2 no se encuentra en el núcleo de los cultivos confluentes y sólo se concentra allí en los cultivos subconfluentes en proliferación (Tapia et al., 2009).

ZO-2 excede el límite de tamaño para poder difundir pasivamente a través de los poros nucleares. Por ello, el tráfico intracelular de ZO-2 se basa en señales de localización (NLS) y exportación nuclear (NES). ZO-2 canina posee cuatro NES funcionales, dos localizadas en el PDZ-2 y el resto en el dominio GK (Gonzalez-Mariscal et al., 2006). ZO-2 tiene además dos NLS bipartitas (bNLS) y una monopartita, en la región U2 presente entre los dominios PDZ-1 y PDZ-2. Las NLS se basan en secuencias con carga positiva de los residuos R o K. Sin embargo, la bNLS-2 posee además tres residuos de serina (S257, S259 y S261) que al fosforilarse neutralizan las cargas positivas de la señal y retardan la importación de ZO-2 al núcleo (Quiros et al., 2013). ZO-2 posee en la región U2 dieciséis repetidos de serina y arginina (SR) (Jaramillo et al., 2004), que son blancos de la cinasa SRPK, que se activa por AKT ante la presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF). La fosforilación de ZO-2 por SRPK induce la entrada de ZO-2 al núcleo y su acumulación en moteados (Quiros et al., 2013). La fosforilación de la S369 de la NES-1 por la PKCε activa a esta señal y permite la salida de ZO-2 del núcleo (Chamorro et al., 2009). Así mismo, la O-GlcNAcilación de la S257 en la bNLS-2 apaga esta señal y permite (Quiros et al., 2013) la exportación de ZO-2 del núcleo (figura 3).

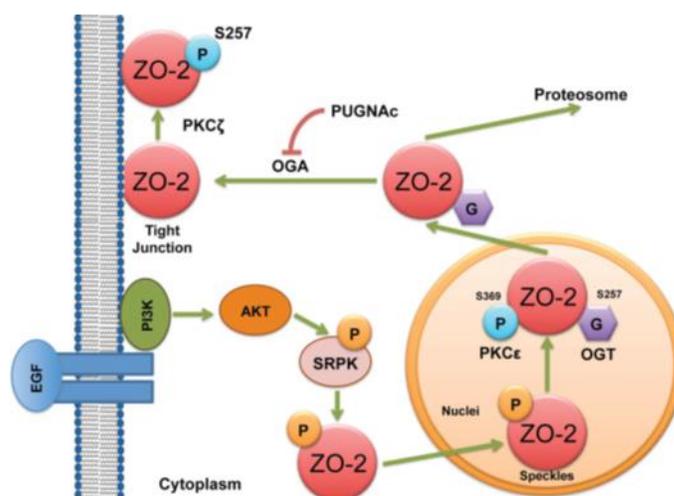


Figura 3. Modelo esquemático del tráfico intracelular de ZO-2. En los cultivos subconfluentes, el EGF activa a AKT e induce la autofosforilación de la cinasa SRPK1. Esta enzima, fosforila a los residuos SR de ZO-2 induciendo la entrada de esta proteína al núcleo. La fosforilación por la PKCε de la S369 ubicada en la NES-1 de ZO-2 activa a esta señal, mientras que la O-GlcNAcilación en la S257 localizada en la bNLS-2 la apaga. En conjunto estos eventos permiten la exportación de ZO-2 del núcleo [Imagen tomada de (Quiros et al., 2013)].

1.3.3) Regulación transcripcional de ZO-2

En humanos, la transcripción del ARNm de ZO-2 se regula por los promotores alternativos P_A y P_C que dan origen a dos isoformas de ZO-2: ZO-2A y ZO-2C. Ambas isoformas se expresan en células normales, pero únicamente la isoforma ZO-2C que carece de 23 aminoácidos en el extremo amino terminal, se expresa en las células del adenocarcinoma ductal de páncreas (Chlenski et al., 1999).

Se cree que el factor de transcripción Sp1 regula al promotor P_A en el gen ZO-2 humano, pues de 33 sitios de unión a factores de transcripción, 27 sitios son de Sp1 y 6 de Zeste (Fig 4). Sp1 es un factor de transcripción ubicuo que funciona como activador transcripcional de una gran variedad de genes, incluyendo genes de mantenimiento, reguladores del ciclo celular y genes específicos de los tejidos [Para revisión ver (O'Connor et al., 2016)].

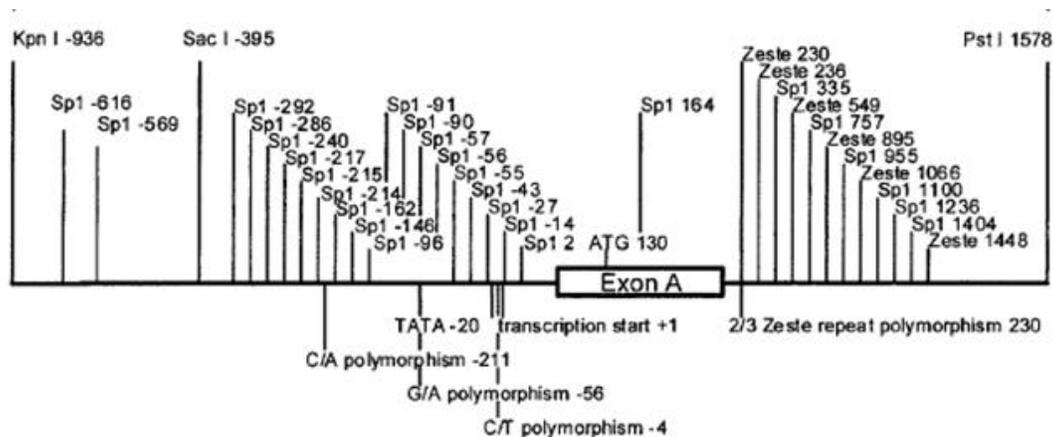


Figura 4. Promotor A de ZO-2 humano. Este promotor contiene 33 sitios de unión a factores de transcripción, de los cuales 27 son de unión Sp1 y 6 a Zeste [Imagen tomada de (Chlenski et al., 1999)].

1.3.4) Función de ZO-2

ZO-2 es una proteína plataforma con múltiples dominios de unión proteína-proteína. En la membrana plasmática ZO-2 se une a proteínas de la UE, la UA, la unión comunicante y el citoesqueleto. En cambio, en el núcleo ZO-2 se asocia con diversos factores nucleares e inhibe la transcripción de genes. Por ello podemos decir que la función de ZO-2 depende de su localización.

a) Función de ZO-2 en la membrana

En las células epiteliales, cuando la expresión de ZO-1 y ZO-2 se suprimió respectivamente, por recombinación homóloga y un ARN de interferencia (ZO-1 KO/ZO-2 KD), no se formaron los filamentos de la UE. Por ello se concluyó que ZO-2 y ZO-1 tienen un papel fundamental en la polimerización de las claudinas en los filamentos de la UE. La función de ZO-1 y ZO-2 es redundante ya que la reintroducción de cualquiera de las dos proteínas provoca la reaparición de los filamentos de la UE (Umeda et al., 2006).

ZO-1 y ZO-2 son esenciales durante el desarrollo, pues los embriones de ratón KO de estas proteínas no son viables. Los embriones que carecen de ZO-1, mueren en la etapa embrionaria 10.5 y tienen alteraciones en la angiogénesis (Katsuno et al., 2008). En cambio, los ratones que carecen de ZO-2 mueren en la etapa 7.5 por un aumento en la apoptosis y una disminución en la proliferación celular (Xu et al., 2008). Los ratones quimeras de ZO-2, que se obtienen después de sustituir en blastocistos silvestres a las células de la masa celular interna, que darán origen al embrión, por células ZO-2 KO, son viables. Esto indica que ZO-2 no es crucial para el desarrollo del embrión, pero sí es indispensable para la formación del tejido extra-embriónico que proviene del trofoblasto. Sin embargo, el ratón quimera desarrolla una barrera hemato testicular defectuosa en la edad adulta, aun cuando exhibe una localización y expresión normal de ZO-1, claudina-11 y ocludina, los principales constituyentes de las UEs en los túbulos seminíferos (Xu et al., 2009). Esto indica que en el testículo del ratón, ZO-2 es esencial para el sellado de las UEs.

b) Función de ZO-2 en el núcleo

ZO-2 se localiza en los moteados nucleares, donde se asocia al PI-4-5 bifosfato (Meerschaert et al., 2009), a SC-35, un factor esencial de procesamiento alternativo del pre-ARNm (Islas et al., 2002), a la proteína ZASP (Lechuga et al., 2010) y a SAF-B (Traweger et al., 2003), un factor involucrado en la represión transcripcional (Hong et al., 2012). ZO-2 también se une a los factores de transcripción Jun, Fos, C/EBP (Betanzos et al., 2004), c-myc (Huerta et al., 2007), KyoT2 (Huang et al., 2002) y TEAD (Gallego-Gutierrez et al., 2021). En los cultivos subconfluentes los factores de transcripción Jun, Fos y C/EBP se concentran en

el núcleo, mientras que en las monocapas confluentes son abundantes en la membrana plasmática, donde se asocian a ZO-2. La salida y entrada de ZO-2 al núcleo regula la localización del factor de transcripción TEAD a través de un mecanismo que involucra la fosforilación por nPKC δ y ϵ (Gallego-Gutierrez et al., 2021). De esta manera, ZO-2 también regula la transcripción de genes al translocar factores de transcripción al núcleo, así como al retenerlos en la UE.

La sobreexpresión de ZO-2 inhibe la transcripción de genes reporteros bajo el control de promotores con sitios AP-1 (Betanzos et al., 2004), así como la transcripción de la ciclina D1 (CD1), mediante la interacción con el factor de transcripción c-myc (Huerta et al., 2007) que reconoce a la caja E en el promotor de la CD1. La desacetilasa de histona 1 (HDAC1) se asocia con ZO-2 y c-myc para reprimir la transcripción de la CD1, mientras que la proteína ZASP bloquea la actividad inhibitoria de ZO-2 en el promotor de la CD1. ZO-2 también bloquea a la ruta Wnt, pues su sobreexpresión, reprime la transcripción de un gen reportero controlado por los sitios TCF/LEF, así como la transcripción de *axina1*, un gen blanco de la ruta Wnt (Tapia et al., 2009). Por otra parte, la ausencia de ZO-2 favorece el reclutamiento nuclear de YAP, el efector final de la ruta Hippo. Como YAP es un cofactor transcripcional que se une al factor de transcripción TEAD, la falta de ZO-2 promueve la actividad transcripcional de un promotor artificial regulado por 8 sitios TEAD y del promotor natural del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), un gen blanco de YAP. Así mismo, la sobreexpresión de ZO-2 reprime la transcripción de genes regulados por sitios TEAD (Dominguez-Calderon et al., 2016; Gallego-Gutierrez et al., 2021).

ZO-2 también participa en el mantenimiento de la forma del núcleo por lo que en su ausencia, los núcleos adquieren una forma irregular lobulada con múltiples indentaciones (Hernandez-Guzman et al., 2021). Al respecto, recién se vio que ZO-2 actúa como una proteína adaptadora que se une por una parte con el núcleoesqueleto de lamina B1 y actina y por otro lado con la proteína SUN-1 del complejo LINC (Hernandez-Guzman et al., 2021). SUN-1 atraviesa la membrana interna de la envoltura nuclear e interacciona con las nesprinas 3 y 4 quienes a través de la plectina y la kinesina respectivamente, se unen al citoesqueleto de vimentina y microtúbulos. Por ello, la interacción de ZO-2 con las proteínas

del núcleoesqueleto y de la membrana nuclear interna es esencial para mantener la forma del núcleo (Hernandez-Guzman et al., 2021).

1.4) Regulación del tamaño celular

Durante el desarrollo, las células pasan por periodos largos de crecimiento, proliferación y diferenciación. En el organismo adulto, aunque las células siguen proliferando, el organismo entero permanece del mismo tamaño debido a diversos mecanismos que mantienen el tamaño de las células con el fin de preservar la función de los órganos y tejidos (Lloyd, 2013). Dentro de los mecanismos que regulan el tamaño celular se encuentran las vías Hippo y mTOR.

1.4.1) Vía Hippo

La vía Hippo se definió por primera vez en *Drosophila melanogaster*, donde se observó que la inactivación de los genes *Warts (Wts)*, *Hippo (Hpo)*, *Salvador (Sav)* y *Mats* generaba un fenotipo similar, caracterizado por el crecimiento excesivo de los tejidos. Posteriormente, se identificó a Yorkie (Yki) como el efector final de la vía Hippo que interactúa con el factor de transcripción *Scalloped (Sd)*. La vía Hippo se conserva en los mamíferos, siendo MST1/2 (mammalian Ste2-like) el ortólogo de Hpo; LATS1/2 (large tumor suppressor) el ortólogo de Wts; Mob1 el ortólogo de MOBKL1A, MOBKL1B y Mats; y YAP/TAZ los ortólogos de Yki (Yu and Guan, 2013).

MST y la proteína plataforma Sav forman heterotetrámeros en el borde celular. La formación de estos complejos promueve la activación de MST por trans-autofosforilación en los residuos T183/T180 ubicados en su asa de activación (Bae et al., 2017). MST activa fosforila a MOB1, la proteína plataforma de LATS, lo que permite la interacción de MST con LATS en el borde celular (Zheng and Pan, 2019) (figura 5).

MST1/2 fosforila a LATS en los residuos T1079/T1041 ubicados en el motivo hidrofóbico terminal (HM). Esta fosforilación promueve la autofosforilación de LATS en las serinas 909 y 872 de su asa de activación (Asa-T) (figura 5). La fosforilación de LATS en los motivos HM y asa-T es necesaria para su activación completa y función (Chan et al., 2005; Hoa et al.,

2016). Este sistema cuenta con un modo de regulación negativo que consiste en el reclutamiento por MST fosforilada del complejo STRIPAK de la fosfatasa 2 (PP2A) que desfosforila a MST.

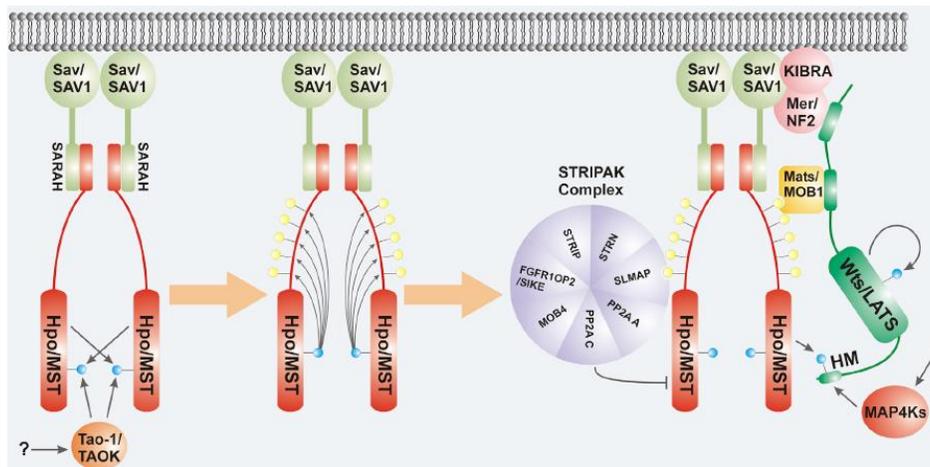


Figura 5. Modelo esquemático de la activación de LATS por MST. En el borde celular SAV y MST forman heterotetrámeros que promueven la fosforilación de MST. MST fosforilada (círculos amarillos) recluta a MOB1, la proteína plataforma de la cinasa LATS. La interacción de MST con MOB1 favorece la fosforilación del motivo HM de LATS por MST y la autofosforilación de LATS. Ambas fosforilaciones son necesarias para la activación de LATS. Por otra parte, MST fosforilada recluta al complejo de fosfatasas STRIPAK PP2A que desfosforila e inactiva a MST, como sistema de regulación negativo [Imagen tomada de (Zheng and Pan, 2019)].

LATS1/2 al fosforilar a YAP en la Ser127 (Zhao et al., 2007) crea sitios de unión a 14.3.3 (Basu et al., 2003). Esto promueve la localización citoplasmática de YAP (Zhao et al., 2007) y su fosforilación posterior por la caseína cinasa (CK 1 δ/ϵ). Así, YAP fosforilada por LATS1/2 y CK 1 δ/ϵ es afín a la ubiquitin ligasa *SCF E3* que la ubiquitina para su posterior degradación en el proteosoma (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010). En cambio, cuando YAP no se fosforila, entra al núcleo, se une al factor de transcripción TEAD y promueve la transcripción de genes involucrados en la proliferación y el crecimiento (figura 6). YAP/TAZ también interactúan con otros factores de transcripción como: Smad, Runx1/2, p73, ErbB4, Pax3 y TBX5 (Mo et al., 2014).

LATS también se regula a nivel transcripcional y es un gen blanco de YAP/TAZ. La regulación de LATS constituye un mecanismo de retroalimentación negativo para mantener

la homeostasis de la vía Hippo y prevenir la sobre activación de YAP y TAZ (Chen et al., 2015; Moroishi et al., 2015).

Por espectrometría de masas se observó que la estimulación de la vía Hippo mediante la inhibición de fosfatasa de serina y treonina con ácido okadaico promueve la interacción de ZO-2 con la cinasa LATS1/2 y su blanco YAP (Couzens et al., 2013). Este resultado sugiere que ZO-2 podría servir como una plataforma que facilite la fosforilación de YAP por LATS.

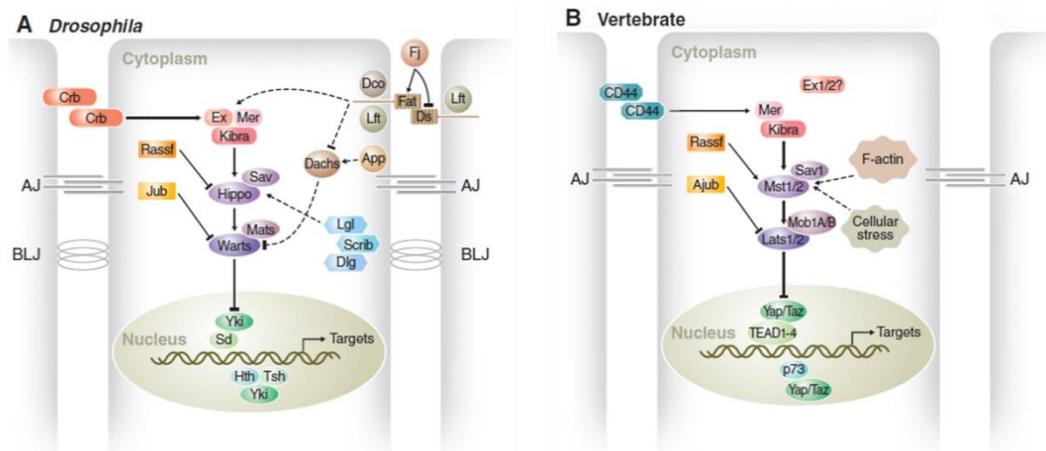


Figura 6. Modelo esquemático de la vía Hippo en Drosophila y vertebrados. En este esquema los componentes de la vía Hippo en Drosophila (A) y los vertebrados (B) se muestra en varios colores. Las flechas y los guiones indican activación e inhibición respectivamente. Las líneas continuas representan a las interacciones conocidas y las líneas punteadas indican mecanismos aun no descritos [Imagen tomada de (Halder and Johnson, 2011)].

1.4.2) Ruta mTOR

mTOR (mechanistic target of rapamycin) es una cinasa de serina/treonina de 289-kDa que en mamíferos constituye la subunidad catalítica de los complejos mTORC1 y mTORC2. Estos complejos difieren en la composición de sus proteínas accesorias y en su afinidad a la rapamicina, así como en la fosforilación de sustratos específicos que determinan su función (Liu and Sabatini, 2020).

El complejo mTORC1 se compone por las proteínas mTOR, mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) y Raptor. Esta última es una proteína esencial para la localización subcelular de mTORC1 y el reclutamiento de los sustratos canónicos del complejo, ya que se une a motivos TOR presentes en las proteínas blanco. La activación del complejo mTORC1

induce un incremento en la producción de proteínas, lípidos, nucleótidos y ATP y limita la autofagia de los componentes celulares (Liu and Sabatini, 2020). El complejo mTORC1 se activa por factores de crecimiento y mitógenos. mTORC1 activo promueve la síntesis de proteínas al fosforilar a la cinasa p70 S6 (S6K1) en la T389 (Burnett et al., 1998). Posteriormente, S6K fosforila a la proteína ribosomal S6, un componente de la subunidad ribosomal 40S. La fosforilación de S6 promueve la transcripción de genes involucrados en la biogénesis ribosomal (Chauvin et al., 2014).

Se ha demostrado que tanto S6K como la proteína S6 son reguladores críticos del tamaño celular. El silenciamiento de S6K en *Drosophila* y en embriones de ratón hace que los animales sean de menor tamaño en comparación con los silvestres. La disminución en la talla del animal se debe a una reducción del tamaño celular y no a una menor proliferación (Montagne et al., 1999) (Shima et al., 1998). En las células MDCK que carecen de ZO-2, la activación de S6K induce hipertrofia celular y en consecuencia al tratar a las células con rapamicina o un siARN contra Raptor, el tamaño celular se reduce y vuelve a la normalidad (Dominguez-Calderon et al., 2016).

1.5 Papel de ZO-2 en la regulación del tamaño celular

En las células MDCK derivadas de riñón de perro, el silenciamiento de ZO-2 por tres shARNs induce hipertrofia por dos mecanismos: 1) Prolonga el tiempo que las células permanecen en la fase G1 del ciclo celular debido a un incremento en el nivel de ciclina D1 que desbalancea el cociente de ciclina D1/ciclina E. 2) Aumenta la síntesis de proteínas en respuesta a la acumulación nuclear de la proteína YAP (Yes-associated protein), el efector final de la vía Hippo, y la activación subsecuente de la ruta mTORC1 (Dominguez-Calderon et al., 2016) (Fig.7).

En el núcleo, YAP induce la transcripción del miARN29 que se une a la región 3'UTR de PTEN e inhibe su traducción (Tumaneng et al., 2012). YAP también activa la transcripción del gen *Pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica p110 de PI3K. Al disminuir la expresión de PTEN y aumentar la concentración de PI3K, sube el contenido de PIP₃ que activa a la vía Akt/mTORC1 que fosforila a la cinasa S6K e induce un incremento en la síntesis

de proteínas. Esto sube el cociente proteína/DNA llevando a las células a hipertrofia. La activación de Akt también incrementa la fosforilación inhibitoria de GSK-3 β que promueve la acumulación nuclear de la β -catenina y la consecuente expresión de genes relacionados con la transición epitelio mesénquima (TEM).

1.5.1) El complejo APC/SAV/LATS y su relación con la activación de AKT y el silenciamiento de ZO-2

Por otra parte, la proteína APC (adenomatous polyposis coli) que funciona como plataforma del complejo de destrucción de la β -catenina, en la vía Hippo, promueve la interacción entre la cinasa LATS y la proteína plataforma SAV1. La formación del complejo APC/SAV/LATS induce la fosforilación de YAP y su localización en el citoplasma. En cambio, cuando AKT se activa, fosforila a GSK-3 β en la serina 9 inhibiendo su actividad. De esta manera se bloquea la formación del complejo APC/SAV/LATS y YAP no se fosforila y en consecuencia se acumula en el núcleo (Cai et al., 2015). Esto sugiere que en las células que carecen de ZO-2, al aumentar la fosforilación inhibitoria de GSK-3 β se promoverá la acumulación nuclear de YAP.

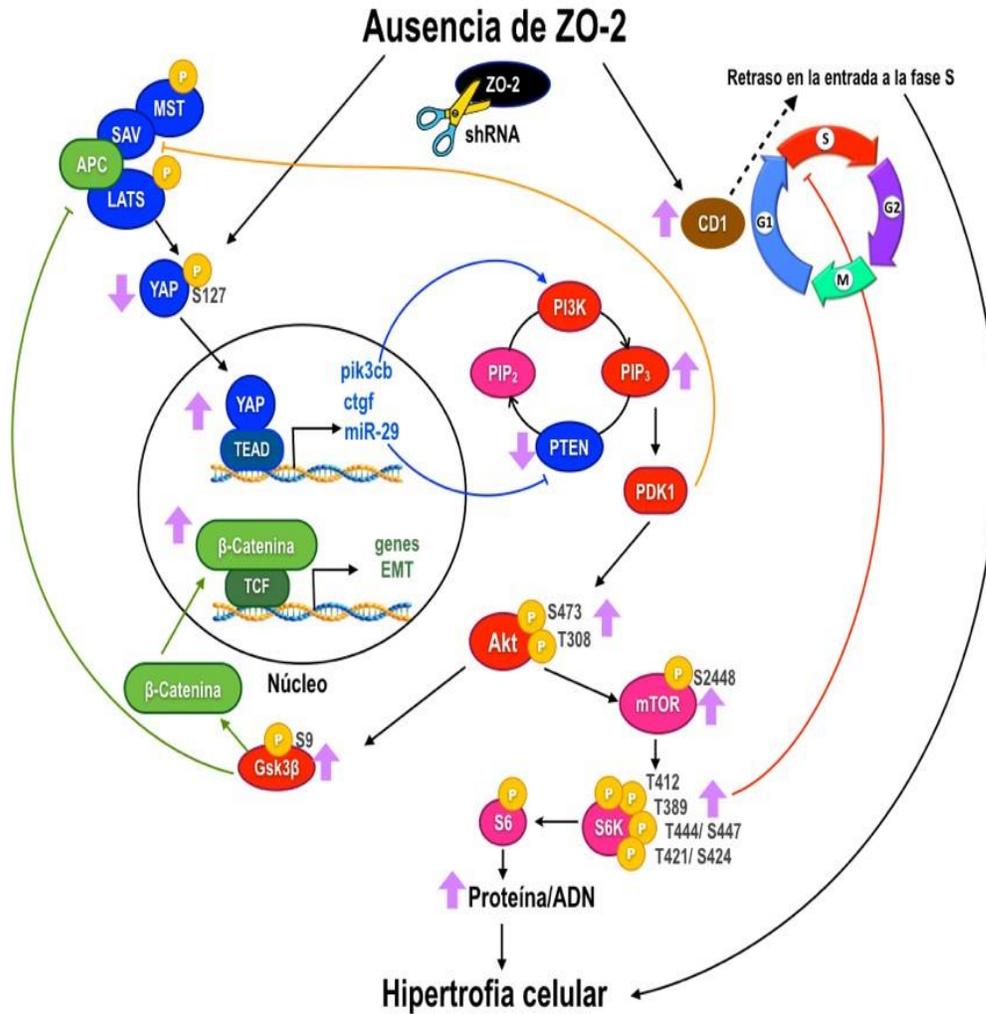


Figura 7. Esquema del mecanismo que induce hipertrofia celular por ausencia de ZO-2. La ausencia de ZO-2 induce hipertrofia por dos vías: 1) incrementa el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular y 2) induce la acumulación de YAP en el núcleo y promueve su actividad transcripcional que activa a la vía PI3K/Akt/mTORC1, lo que conduce a la fosforilación de S6K1 que incrementa la síntesis de proteínas y sube el cociente proteína/DNA. Por otra parte, la fosforilación inhibitoria de GSK3β ocasionada por la activación de Akt bloquea la formación del complejo SAV/APC/LATS1 de la vía Hippo y en consecuencia reduce la fosforilación de YAP y promueve su ingreso al núcleo y actividad transcripcional. Las flechas moradas, representan los cambios generados en las células MDCK cuando se silenció a ZO-2; las líneas azules indican la conexión entre YAP y el complejo PI3K/Akt; con líneas verdes se señala la regulación de la actividad transcripcional de la β-catenina y la vía Hippo por GSK-3β [Imagen tomada de (Dominguez-Calderon et al., 2016)].

1.6) Hipertrofia

La hipertrofia es el aumento del tamaño de un órgano o tejido porque se incrementó la talla de las células. La hipertrofia es distinta de la hiperplasia donde lo que aumenta es el número de células en el tejido.

1.7) Hipertrofia renal y ZO-2

El modelo murino de hipertrofia renal compensatoria (HRC) inducido por nefrectomía unilateral (UNX) se caracteriza por un aumento en el tamaño del riñón remanente y una mayor síntesis de ARN y proteínas, mediada por la activación de la vía mTORC1 (Chen et al., 2005b) y S6K1 (Chen et al., 2009). En la HRC aumenta la talla de las células en los túbulos renales y a la vez en ellos disminuye la expresión de ZO-2 y YAP se acumula en el núcleo (Dominguez-Calderon et al., 2016). En esta tesis nos preguntamos si en otro modelo de hipertrofia, conocido como hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática también disminuye ZO-2.

1.8) Esteatosis hepática

La esteatosis se define como la acumulación excesiva de lípidos en las células. En el hígado dicha acumulación ocurre en el citoplasma de los hepatocitos. El hígado graso puede limitarse a simple esteatosis o progresar hacia esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis, cirrosis y cáncer de hígado (Matteoni et al., 1999). La esteatosis simple plantea un grave riesgo a la salud, pues disminuye la capacidad regenerativa del hígado (Yang et al., 2001) y le impide enfrentar el daño inducido por toxinas (Donthamsetty et al., 2007) o reperfusión post isquemia (Kloek et al., 2012; McCormack et al., 2011).

En los pacientes y animales con esteatosis hepática se eleva la concentración de ácidos biliares en plasma (Dasarathy et al., 2011; Kalhan et al., 2011). Esto se atribuye a un problema metabólico (Tanaka et al., 2012) y a la retención de los ácidos biliares por una disminución en su secreción hacia los canalículos intrahepáticos (Martin et al., 2010). Esto se produce porque disminuye la expresión de la proteína asociada a la resistencia a múltiples drogas 2 (MPR2, también llamada ABCC2) (Pizarro et al., 2004) que funciona como

transportador aniónico en la cara apical de los hepatocitos y a un incremento en la expresión de los transportadores basolaterales que excretan ácidos biliares, OSTB y MRP1/4/5 (Tanaka et al., 2012).

En la esteatosis, la fuga de los ácidos biliares al parénquima hepático y al plasma también podría deberse a la apertura de las UE entre los hepatocitos. Al respecto, cabe destacar que en el hígado humano, ZO-2 tiene una función crítica y no redundante, en comparación con otros epitelios donde otras proteínas de la UE pueden compensar la pérdida de ZO-2.

1.9) Las UE en el hígado

El hígado tiene dos tipos de células epiteliales: los hepatocitos y los colangiocitos. Los hepatocitos poseen una morfología que asemeja a un panal de abeja y su organización es diferente a otras células epiteliales ya que no contiene una cavidad central como ocurre en otros órganos como el estómago, el útero, la próstata etc. En el hígado, la cara apical de los hepatocitos bordea la luz de múltiples y pequeños canalículos biliares. Por ello se dice que el epitelio hepático se asemeja en apariencia a un queso Emmental con múltiples hoyitos (Zeisel et al., 2018). En los hepatocitos, al igual que en el resto de los epitelios, las UEs separan la membrana plasmática en dos dominios: apical y basal (sinusoidal). La membrana apical exhibe microvellosidades y múltiples transportadores, y entre dos hepatocitos adyacentes unidos entre sí por las UEs se forma el inicio de los canalículos biliares (figura 8). El sellado de las UE constituye la base de la barrera hemato-biliar (BBiB) que separa a la sangre presente en los vasos del parénquima subyacente, de la bilis presente en la luz de los canalículos biliares (apicales) (Kojima et al., 2003). Gracias a la BBiB el hígado puede realizar de forma simultánea: 1) la producción y secreción de bilis, y 2) el intercambio metabólico con la circulación sistémica y portal que permite la desintoxicación y excreción de las proteínas y factores de coagulación (Roehlen et al., 2020). Por ello si en el hígado se altera la expresión y localización de las proteínas de la UE se produce daño hepático severo.

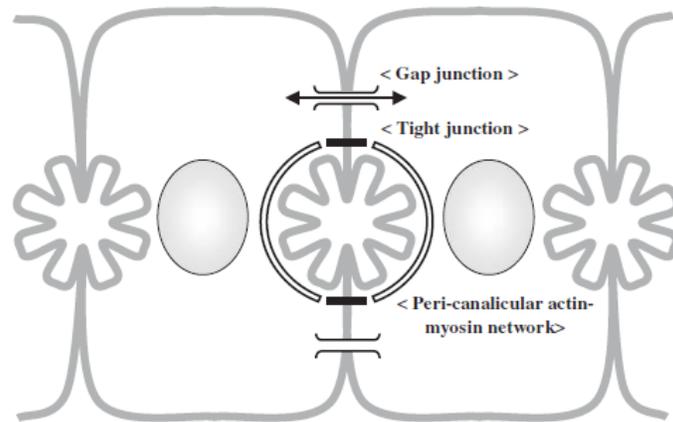


Figura 8. Modelo esquemático de la formación de los canalículos biliares en el hígado. En el hígado los canalículos biliares se forman por las membranas apicales de dos hepatocitos adyacentes flanqueados por las proteínas de la UE [Imagen tomada de (Kojima et al., 2003)].

Una de las principales funciones del hígado es la formación de los ácidos biliares. Estos se transportan a través de la membrana apical de los hepatocitos hacia el lumen del canalículo biliar, y por medio de los ductos biliares extrahepáticos llegan al tracto intestinal donde solubilizan a los lípidos de la dieta. Los ácidos biliares son detergentes potentes y por lo tanto es importante prevenir su fuga hacia la cara basolateral de los hepatocitos y el parénquima subyacente.

En las UEs de los hepatocitos se expresan las claudinas -1, -2 y -3 (Furuse et al., 1998) (Rahner et al., 2001) (Morita et al., 1999). En el hígado, las claudinas -1 y -3 se expresan en las UEs de todos los hepatocitos, mientras que la claudina-2 se expresa únicamente en aquellos cercanos a la vena central (Fig. 9) (Rahner et al., 2001). La claudina-2 es importante para facilitar el flujo paracelular de agua que se requiere para obtener una composición adecuada de la bilis. Por ello, en el ratón deficiente de claudina-2 la bilis se concentra y se forman piedras de colesterol (Matsumoto et al., 2014).

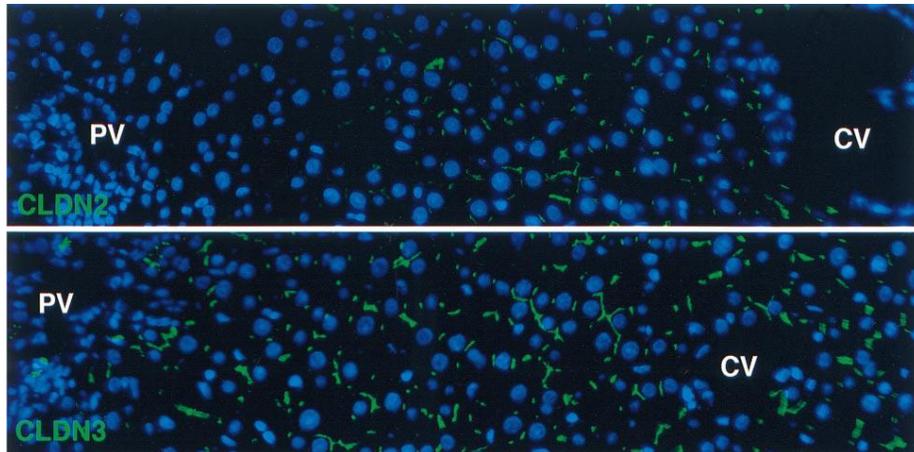


Figura 9. Inmunofluorescencia de las claudinas -2 y -3 en hígado de rata. En el lobulillo hepático la claudina-3 se expresa de manera ubicua, mientras que la claudina-2 se observa únicamente en las uniones estrechas de los hepatocitos próximos a la vena central (CV) [Imagen tomada de (Rahner et al., 2001)].

1.10) ZO-2 y su relación con la colestasis intrahepática

La colestasis intrahepática familiar progresiva (CIFP) es una enfermedad grave que se caracteriza por una falla en la secreción de las sales biliares y otros componentes de la bilis que conduce a falla hepática, cirrosis y cáncer en los primeros años de vida (Jaquotot-Herranz et al., 2013). La CIFP se ha clasificado en 4 tipos dependiendo del gen mutado que la origina, pero en todos los casos las mutaciones son homocigotas: a) tipo 1 en el gen *ATP8B1*, que codifica para una ATP-asa tipo P que funciona como una flipasa (FIC1) que reduce el contenido de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana apical de los hepatocitos, y de esta manera la hace más resistente a los ácidos biliares (Paulusma et al., 2010); b) tipo 2 en el gen *ABCB11*, que codifica a la proteína transportadora de ácidos biliares (BSEP) (Lam et al., 2010); c) tipo 3 en el gen *ABCB4* que codifica a la proteína resistente a múltiples fármacos tipo 3 (MDR3), una flipasa que promueve la presencia de fosfatidilcolina en la cara externa de la membrana apical de los hepatocitos (Gordo-Gilart et al., 2015); y d) tipo 4 en *TJP2*, el gen que codifica a ZO-2 (Sambrotta et al., 2014).

Los infantes con CIFP4 tienen mutaciones puntuales en *TJP2* que bloquean su transcripción y por ende la expresión de la proteína ZO-2 (Ge et al., 2019; Sambrotta et al., 2014; Sambrotta and Thompson, 2015). La falta de ZO-2 impide la correcta localización de la claudina-1 en los bordes de los canalículos biliares. Así, las UEs no se sellan y la bilis se

fuga hacia la superficie basolateral, también llamada sinusoidal, dañando de manera irreversible a los hepatocitos, lo que conduce al desarrollo de la cirrosis y el carcinoma hepatocelular pediátrico (Parsons et al., 2016; Vij et al., 2017; Zhou et al., 2015).

En los pacientes con CIFP tipo 4, la mutación de *TJP2* apaga la expresión de ZO-2 no solo en el hígado sino en todas las células epiteliales del organismo. Sin embargo, los pacientes solo reportan daño hepático, lo que sugiere que ZO-2 tienen un papel crucial en el hígado humano que no puede compensarse por otras proteínas similares de las UEs como ZO-1 o ZO-3, como probablemente sucede en el resto de los epitelios del cuerpo.

En la hipercolanemia familiar (HCF), que se caracteriza por una alta concentración de ácidos biliares en el suero, comezón y mala absorción de grasas, los pacientes presentan simultáneamente mutaciones en dos genes distintos: *TJP2* y *BAAT*. Este último codifica a una enzima de conjugación de los ácidos biliares. En ZO-2 la mutación produce la sustitución de la valina 48 por alanina y esto reduce la estabilidad del dominio PDZ-1 porque pierde su estructura helicoidal. *In vitro* este cambio bloquea la unión del dominio PDZ-1 de ZO-2 a las claudinas -1, -2, -3, -5 y -7, lo que podría explicar la filtración de ácidos biliares al suero por la apertura de las UEs (Carlton et al., 2003).

La colestasis intrahepática del embarazo (CIE) que se asocia con parto pretérmino espontáneo, presencia de meconio en el líquido amniótico e incluso muerte fetal, se caracteriza por prurito materno en las plantas de las manos y los pies, alteraciones en las pruebas de función hepática y elevación del nivel de ácidos biliares en suero (Wood et al., 2018). Las mujeres embarazadas con este padecimiento exhiben mutaciones heterocigotas en los dominios PDZ1 (T62M) y SH3 (T626S) de ZO-2 o en uno de los cuatro genes que codifican transportadores en el hígado (*ABCB4*, *ABCB11*, *ABCC2* and *ATP8B1*) cuya mutación homocigota produce CIFP (Dixon et al., 2017). Aunque la CIE tiene una resolución completa después del parto, presenta altas tasas de recurrencia en embarazos posteriores.

Los ratones donde se noqueó selectivamente la expresión en los hepatocitos y colangiocitos de ZO-2 (ZO-2 KD) no exhiben una apertura completa de la BBiB pero si expresan menos claudina-1 y desarrollan una leve colestasis progresiva que se caracteriza por una baja expresión del transportador de ácidos biliares *Abc11/Bsep* y de la enzima

desintoxicante Cyp2b10. Estos animales, sin embargo, son mucho más sensibles al daño hepático inducido por el ácido cólico (Xu et al., 2021). En contraste los ratones con el doble KO de ZO-1 /ZO-2 en el hígado muestran una BBiB sin UEs y mueren después a la sexta semana (Itoh et al., 2021). Estas observaciones sugieren que en el hígado del ratón ZO-2 es importante para la BBiB, pero su función puede compensarse con ZO-1.

1.11) La rata Zucker obesa como modelo de esteatosis hepática

En las ratas Zucker (*fa/fa*) se sustituye la glutamina por prolina en el codón 269 ubicado en el dominio extracelular del receptor a leptina (Iida et al., 1996). La leptina es una hormona producida predominantemente por las células adiposas, que inhibe el hambre [Para revisión ver (Kelesidis et al., 2010)]. La obesidad en las ratas Zucker se hereda como un rasgo recesivo y los animales afectados son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos (Kava et al., 1990). Estos animales a las 7 semanas de edad son hipertrigliceridémicos, resistentes a la insulina y desarrollan esteatosis; a la semana 14 desarrollan diabetes tipo 2 y en la semana 21 exhiben una deficiente secreción de insulina (Forcheron et al., 2009).

II) Planteamiento del problema

En las células MDCK el silenciamiento de ZO-2 induce hipertrofia celular a través de dos mecanismos: 1) prolonga el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular y 2) aumenta la síntesis de proteínas en respuesta a la acumulación nuclear de YAP, la proteína blanco de la vía Hippo. Por otra parte, en el modelo murino de hipertrofia renal compensatoria inducida por uninefrectomía, disminuye la expresión de ZO-2 y YAP se concentra en el núcleo. Con base en estos antecedentes, en esta tesis nos preguntamos si el silenciamiento de ZO-2 es una característica común de los órganos hipertróficos o se limita únicamente al riñón. Además, nos interesamos en dilucidar el mecanismo que regula el silenciamiento de ZO-2 en las células hipertróficas e investigamos si ZO-2 interactúa con las proteínas de la vía Hippo que regulan el tamaño celular.

III) Objetivo general

Analizar si ZO-2 funciona como una proteína plataforma de la vía Hippo para la fosforilación de YAP y si su expresión disminuye en un modelo de hipertrofia hepática (esteatosis).

IV) Hipótesis

ZO-2 funciona como una proteína plataforma para la activación de la vía Hippo y el silenciamiento de ZO-2 es una característica común presente en los órganos con hipertrofia.

V Metodología

5.1) Cultivo celular

Las células epiteliales de riñón de perro MDCK (Madin Darby canine kidney) parentales (control) y ZO-2 KD las donó generosamente el Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC). Las células ZO-2 KD expresan de manera estable una mezcla de tres shARNs contra ZO-2 en el vector pSuper, mientras que las células parentales expresan al vector vacío. La línea celular estable ZO-2 KD empleada en este trabajo (IC5) se obtuvo con base en su resistencia a Zeocina. Las células se cultivaron de acuerdo a lo reportado anteriormente (Gonzalez-Mariscal et al., 1985).

Las células epiteliales embrionarias derivadas de riñón humano, HEK-293T (Cat. CRL-3216, ATCC, Manassas, VA) se cultivaron en medio DMEM de alta glucosa (Cat. 11965-118, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado con 5% de suero fetal bovino y una mezcla de penicilina-estreptomicina 10,000 (U/ μ g/ml) (Cat. A-01, In Vitro, Mexico).

5.2) Inmunoprecipitación de ZO-2 y LATS

La inmunoprecipitación de ZO-2 y LATS se realizó añadiendo 1 μ l de anticuerpo anti-ZO-2 (Cat. 71-1400, Invitrogen, Carlsbad, CA) o LATS1 (Cat. 3477, Cell Signaling, Danvers, MA) a 300 μ g de proteína derivados de lisados de células MDCK. Para ello, las células se lisaron con 80 μ l de solución amortiguadora RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1.0% desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS, 0.4 mg/ml PMSF e inhibidores de proteasas). En seguida, el lisado celular se transfirió a tubos eppendorf y para romper los grumos de células, el lisado se pasó 8 veces a través de una jeringa de 1 ml. Después, los extractos celulares se centrifugaron a 13, 000 rpms durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf y se clarificó por 30 minutos a 4°C con 5 μ l de perlas de agarosa recubiertas de proteína A (Cat.11134515001, Roche, Basilea, Suiza). En seguida, los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 3 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos eppendorf. A cada tubo con 300 μ g de proteína del lisado se le agregó 1 μ l de anticuerpo anti-ZO-2 o anti-LATS y al control negativo se le añadió 1 μ l de suero preinmune. Los tubos se dejaron toda la noche en agitación continua a 4°C. Posteriormente, a los tubos

se les agregaron 10 μ l de perlas de agarosa recubiertas de proteína A y se dejaron nuevamente toda la noche en agitación constante a 4°C. En seguida, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpms por 3 minutos a 4°C y el sobrenadante se descartó. Las pastillas se diluyeron en solución amortiguadora de carga (150 mM Tris-HCl; 5% SDS; glicerol 30% y 2-mercaptoetanol a pH 6.8) y los inmunoprecipitados se corrieron en geles de poliacrilamida en gradientes del 4% al 12%. Posteriormente las proteínas se transfirieron de los geles a las membranas de PVDF.

5.3) Ensayo de arrastre de proteínas

Las células HEK293T se transfectaron con las construcciones de ZO-2 correspondientes a los segmentos amino (398-962 nt), 3PSG (1595-3019 nt), o AP (3029-3923 nt) de cZO-2, en el vector pcDNA4/HisMax (Betanzos et al., 2004). Las células se lisaron 24 horas después de la transfección, y el extracto celular se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de níquel afín a la bandera de histidina (His-Tag) (Cat. COHISC-RO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Las fracciones purificadas se corrieron en un gel de poliacrilamida y se analizaron por Western blot con anticuerpos contra 6x His tag (Cat. GTX115045, dilución 1:5000; Genetex, Irvine, CA), anti el segmento amino de ZO-2 (Cat. 71-1400, dilución 1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA), anti la región C-terminal de ZO-2 (Cat. 00238, dilución 1:1000; BiCell Scientific, Maryland Heights, MO) y anti-LATS1 (Cat. 3477, dilución 1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA).

5.4) Inmunofluorescencia de las células MDCK

Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C. Las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.4% de Tritón X-100 en PBS por 10 minutos. Después de 3 lavados con PBS, las monocapas se bloquearon por 1 hora con albúmina de suero bovino libre de inmunoglobulinas [Ig] (Cat. 1331-A, Research Organics, Cleveland, OH) al 1% (p/v) en PBS. A continuación, las monocapas se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos policlonales de conejo anti: phosphoLATS-1 S909 (Cat. 9157,

dilución 1:100, Cell signaling, Danvers, MA) y Sp1 (Cat. GTX110593, dilución 1:200; Genetex, Irvine, CA). Después de 3 lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 594 (Cat. A21207, dilución 1:750, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se examinaron en un microscopio confocal (Leica TC5, SP8, Wetzlar, Alemania) y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Sp1 en el núcleo se realizó con el programa imageJ. Las imágenes de los núcleos teñidos con DAPI se utilizaron para definir la región en la que posteriormente se cuantificó la fluorescencia de Sp1.

5.5) Inmunodetección de proteínas (Western blot)

La inmunodetección se realizó siguiendo un protocolo reportado previamente (Quiros et al., 2013) donde únicamente se modificó la solución amortiguadora de carga. Para los lisados de las células MDCK se utilizó una solución amortiguadora de muestra comercial (Cat. NP0008, Invitrogene, Carlsbad, CA), mientras que para las fracciones nucleares de los riñones de rata control y UNX, y los lisados de hígado de ratas Zucker obesas y delgadas, se empleó la solución amortiguadora de Laemmli (150 mM Tris-HCL, pH 6.8; 300 mM DTT, 6% SDS, 0.3% azul de bromofenol, 30% glicerol y 20% 2-mercaptoetanol). La inmunodetección se hizo con anticuerpos policlonales de conejo contra: ZO-2 (Cat. 71-1400, dilución 1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA), claudina-1 (Cat. 51-9000, dilución 1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA), Sp1 (Cat. GTX110593, dilución 1:1000, Genetex, Irvine, CA), LATS1 (Cat. 3477, dilución 1:1000, Cell Signaling, Carlsbad, CA), MST1/2 (Cat. B0667, dilución 1:500, Assay Byotech, San Francisco, CA), pLATS S909 (Cat. 9157, dilución 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA), JNK (Cat. 9252, dilution 1:500; Cell Signaling, Danvers, MA), pJNK (Cat. ab131499, dilución 1:500; Abcam, Cambridge, MA) y LC3-I/ LC3-II (Cat. 2775, dilución 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA). También se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo contra LATS2 (Cat. 5888, dilución 1:500; Cell Signaling, Danvers, MA) y los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón contra: claudina-2 (Cat. Sc 293233, dilución 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), lamina B1 (Cat. 33-2000, dilución 1:20 000, Invitrogen, Carlsbad, CA), y tubulina (Cat. T7816, dilución 1:20 000, Sigma Aldrich, San Louis, MO). Como anticuerpos

secundarios se utilizaron de cabra anti-IgG de conejo (Cat. 9162, dilución 1:20000, Sigma Aldrich, San Louis, MO) y anti-IgG de ratón (Cat. 62-6520, dilución 1:10000, Invitrogen, Carlsbad, CA) acoplados a peroxidasa de rábano. Para revelar las membranas se empleó el sistema de quimioluminiscencia Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Cat.WVKLS 0500, Millipore Corporation, Darmstadt, Germany).

En la figura 11b para la detección de SAV en el inmunoprecipitado de ZO-2 empleamos el reactivo de detección para Western blot HRP TidyBlot (Cat. STAR209, BioRad, Hercules, CA) que, a diferencia de los anticuerpos secundarios convencionales, se une específicamente a los anticuerpos nativos (no reducidos). Este reactivo nos permitió detectar la banda de SAV de 45 kDa sin la interferencia de la cadena pesada desnaturalizada (50 kDa) de la IgG del anticuerpo primario que se libera de las perlas durante los experimentos de inmunoprecipitación.

5.6) Protocolo para inducir la formación de las UE en las células epiteliales

Las monocapas de células MDCK cultivadas en medio con calcio normal (NC, 1.8 mM Ca^{2+}) se transfirieron por una hora a medio con bajo calcio (LC, 1-5 μM Ca^{2+}) y EGTA 2 mM para inducir el desensamble y la endocitosis de las UEs. En seguida, las monocapas se transfirieron a medio NC para inducir la formación *de novo* de las UEs en presencia o ausencia del inhibidor del factor de transcripción Sp1 MTM a una concentración de 400 nM para inhibir al. Después de 6, 12 o 24 horas las monocapas se lisaron con RIPA y en estos lisados mediante Western blot se detectó el contenido de ZO-2.

5.7) Uninefrectomía (UNX)

Las ratas de 8 semanas de edad, con un peso entre 200 a 300 gr, se anestesiaron con pentobarbital sódico intraperitoneal (30 mg/kg). Posteriormente, bajo condiciones estériles, se realizó una incisión en la pared abdominal, se expuso el riñón derecho, se aisló el pedículo renal y se removió el riñón. Después de la cirugía, las ratas regresaron a su caja dónde tuvieron alimento y agua *ad libitum*. Tres semanas después de la cirugía, las ratas se sacrificaron con pentobarbital sódico intraperitoneal (100 mg/kg), y se removió el riñón

remanente que desarrolló HRC. Los riñones se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente la mitad de cada riñón se procesó para inmunodetección de proteínas y el resto para inmunofluorescencia.

5.8) Extracción del ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR)

Para la extracción del ARN se colectaron en trizol (Cat.T9424, Sigma-Aldrich, ST Louis, MO) segmentos de riñón de 50 mg, provenientes de ratas con una operación simulada o uninefrectomizadas (UNX); segmentos de hígado de ratas Zucker obesas y delgadas de 50 mg, así como células MDCK cultivadas en medio con calcio normal (NC) y bajo calcio (LC) con y sin tratamiento con mitramicina (MTM). El ARN total se aisló utilizando el estuche Direct-zol MiniPrep kit (Cat. R2050, Zymo Research, Irvine, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La qRT-PCR se realizó en un solo paso con 20 ng del ARN total utilizando el sistema KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystems. Basilea, Suiza) en un volumen de reacción de 10 µL. Las muestras obtenidas por triplicado se sometieron a qPCR utilizando el Sistema Step One plus Real Time PCR (Cat. 4376600, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Las condiciones de la PCR fueron: 1) un ciclo inicial de 5 minutos a 42 °C, 2) 1 ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 92 °C, 3) 40 ciclos de amplificación de 30 s a 92 °C y 30 s a la temperatura específica (Ta) de alineamiento para cada par de cebadores, y 4) una curva de fusión de 15 s a 95 °C acompañada de 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C. La tabla 1 muestra los oligonucleótidos y las temperaturas de amplificación que se utilizaron:

Muestra	Gen	Sentido	Antisentido	Ta (°C)
Riñón	ZO-2	CTTTCAACTACTCCAAGTCAAACC	GCTATTTCAATCCTCGCATTCTG	62
Riñón	GAPDH	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	GTGGCAGTGATGGCATGGAC	66
MDCK	ZO-2	CTTTCAACTACTCCAAGTCAAACC	GCTATTTCAATCCTCGCATTCTG	62
MDCK	prp0	TACAACCCTGAAGTGCTTGAC	GCAGATGGATCAGCCAAGAAG	64
Hígado	GAPDH	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	GTGGCAGTGATGGCATGGAC	66

Hígado	actina	GCTCGTCGTCGACAACGGCT	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	66
Hígado	ZO-2	CTCTATACACGTCTGCTCGG	GCTGGTGGAAATGATGTTGG	64

Tabla1. Oligonucleótidos y temperaturas de amplificación empleadas en las distintas qRT-PCRs.

La abundancia relativa del ARNm de ZO-2 se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se expresó como: 1) UNX contra operación simulada, en comparación con el ARNm control de GAPDH en el riñón; 2) rata Zucker obesa contra delgada, en comparación con el ARNm de GAPDH en el hígado, y 3) NC a tiempo 0 contra cada condición experimental, en comparación con el ARNm de prp0 en las células MDCK.

5.9) Fraccionamiento nuclear derivado de riñón

Se empleó un protocolo previamente descrito (Aleman et al., 2001) con pequeñas modificaciones. En breve: los riñones frescos se cortaron en rectángulos pequeños con una navaja y los fragmentos se incubaron durante 20 minutos a 4° C en la solución amortiguadora A [3 mM MgCl₂, 0.32 M sacarosa y 10 mM PBS con el coctel de inhibidores de proteasas complete (Cat. 04693132001, Roche Applied Science, Madison, WI)]. En seguida, el tejido se homogenizó a 4° C con 25 golpes de un homodenzador de vidrio con pistilo de teflón. Posteriormente, los homogenados se filtraron a través de un colador para células de 100 µm (Cat. 352360, Falcon Corning, Corning, NY). La suspensión celular obtenida se centrifugó a 3000 RPM durante 20 minutos a 4°C. La pastilla resultante, se resuspendió a 4° C en 10 ml de la solución amortiguadora B (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 4 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂ y 1.16 M sacarosa). La suspensión celular se transfirió a un tubo nuevo con 1.5 ml de un colchón de sacarosa (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 4 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂ y 2 M sacarosa) y se centrifugó a 33 000 RPM por 100 minutos a 4°C. El sobrenadante y el colchón de sacarosa se removieron con cuidado y la pastilla que contenía a los núcleos purificados se resuspendió en RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio y 0.1% SDS) y se sonicó por 30 s. Los extractos nucleares se mantuvieron hasta su uso congelados a -70 °C.

5.10) Análisis de miARNs mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR)

Los pequeños ARNs provenientes de riñones congelados se extrajeron con el estuche de aislamiento miRVana™ (Cat. AM1560; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad de los pequeños ARNs se confirmó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente (Petrov et al., 2013). La cantidad de miARNs en el estado basal se cuantificó por el método de Tallo-burbuja RT-qPCR (Chen et al., 2005a) utilizando el sistema Maxima SYBR™ Green/ROX qPCR Master Mix (Cat. K0223, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) en el termociclador Rotor Gene™ 3000 (Corbett Research Pty Ltd., Australia). Los oligonucleótidos específicos para los miR-23a y b se diseñaron de acuerdo a un trabajo previo (Kramer, 2011), basado en las secuencias obtenidas de la base miRbase (Griffiths-Jones et al., 2008). Los oligonucleótidos para el miR-124 se usaron como se describió previamente (Feng et al., 2016) y el rARN de U6 se utilizó como referencia endógena (Gonzalez-Torres et al., 2018). Las secuencias de los oligonucleótidos se enlistan en la tabla 2. Los amplicones de PCR se secuenciaron usando el estuche de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Cat. 4337455, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) en el secuenciador automático Applied Biosystems Genetic Analyzer 310.

Oligo	Secuencia
RT-23a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGGAAAT
RT-23b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGGTAAT
RT-124*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGGCATTCA
RT-137	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTACGCGT
RT-U6	AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG

U6-Fwd	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
U6-Rev	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
miR-23a/b-Fwd	CGAGCATCACATTGCCAGGG
mir-124-Fwd*	GATACTCATAAGGCACGCGG
miR-137 Fwd	TACGCTGCGCTTTATTGCTTAAGAAT
UnivRev*	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos para miR-23a, miR-23b, miR-124, miR-137 y U6.

5.11) Ratas Zucker diabéticas obesas

Las ratas macho Zucker obesas (OZ) y delgadas (LZ) de 12 semanas de edad se obtuvieron del bioterio Claude Bernard de la Universidad de Puebla. Todos los protocolos que involucran animales se aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales y siguieron las pautas publicadas para el cuidado y el uso de animales de laboratorio por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz/obscuridad de 12:12 h a 22 °C con acceso libre al alimento (LabDiet 5008) y agua. Tres días antes de sacrificar a los animales se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa. Para este propósito, por la mañana se analizó la glucosa en sangre mediante una punción en la cola y con el sistema de tira reactiva Contour TS (Bayer). Esta medida se consideró una prueba de glucosa espontánea. En seguida, los animales se privaron de alimento, pero mantuvieron el libre acceso al agua. Después de 6 horas de ayuno se midió la glucosa en sangre, en seguida se hizo una administración intraperitoneal de glucosa (2mg/Kg) y se evaluó la glucosa en sangre cada 30 minutos por 2 horas. Las ratas OZ con niveles de glucosa por arriba de 200 mg/dL se consideraron diabéticas y se excluyeron del estudio.

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical después de la inducción de anestesia con sevoflurano (3-5%). Los hígados se extrajeron inmediatamente, se perfundieron a

través de la vena portal y se procesaron para Western blot, microscopía electrónica e inmunofluorescencia.

5.12) Inmunofluorescencias en hígado

Se obtuvieron hígados de ratas Zucker delgadas y obesas. Los tejidos se lavaron tres veces con PBS a 4°C, se cortaron en pedazos pequeños, se sumergieron por 2 minutos en 2-metilbutano a 4°C y se transfirieron a nitrógeno líquido por 10 minutos. En seguida, los tejidos se cortaron en rebanadas de 7 µm de grosor con un criostato (Leica CM. No. catálogo, 1900-3-1, Wetzlar, Alemania), se colocaron en portaobjetos recubiertos con gelatina al 0.5% y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las rebanadas de tejido posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS a 4°C. Posteriormente, las muestras de hígado se sometieron a diferentes tratamientos de acuerdo al anticuerpo empleado. Los cortes con el anticuerpo policlonal de conejo anti-claudina-1 (Cat. 51-9000, dilución 1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA) o el anticuerpo monoclonal de ratón anti-claudina-2 (Cat. Sc 293233, dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se fijaron con etanol al 100% a -20 °C por 10 minutos. En seguida, se lavaron con PBS frío y se trataron con acetona a -20°C por 3 minutos. Posteriormente, se hidrataron con PBS durante 30 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.25% en PBS durante 10 minutos. En cambio, los cortes tratados con anticuerpos de conejo anti ZO-1 (Cat. 61-7300, dilución 1:300; Invitrogen, Carlsbad, CA), ZO-2 (Cat. 71-1400, dilución 1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA), Sp1 (Cat. GTX110593, dilución 1:100; Genetex, Irvine, CA) o YAP (dilución 1:500, generosamente donado por Marius Sudol, Instituto de Mecanobiología, Universidad Nacional de Singapur, Singapur) se sumergieron en acetona a -20°C por 3 minutos, se hidrataron con PBS frío y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 15 minutos. Como anticuerpos secundarios se emplearon de burro anti-IgG de conejo acoplado a Alexa-Fluor 594 (Cat. A21207, dilución 1:750, Invitrogen, Carlsbad, CA) y de cabra anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (Cat. A11001, dilución 1:750, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se examinaron en un microscopio confocal (Leica TCS, SP8, Wetzlar, Alemania) y

la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de Sp1 en el núcleo se realizó con el programa imageJ. Las imágenes de los núcleos teñidos con DAPI se utilizaron para definir la región en la que posteriormente se cuantificó la fluorescencia de Sp1.

5.13) Ensayo de flujo de LC3-II

Las ratas Zucker obesas (OZ) y delgadas (LZ) se sometieron a un ayuno de 24 horas y en seguida se sacrificaron por dislocación cervical. Los hígados se extrajeron y se colocaron en PBS pH 7.4 a 4°C. Se hicieron rebanadas de hígado de 200 µm de grosor con un microtomo (Cat. 054026; Technical Products International, Saint Louis, MO) y se colectaron en PBS pH 7.4 a 4°C. Las rebanadas se colocaron en placas de plástico con 12 pozos y se bañaron con 0.5 ml de DMEM con 10% de suero de ternera recién nacida. A la mitad de los pozos se les añadió NH₄Cl a una concentración final de 10 mM. Los pozos con las rebanadas de hígado se incubaron a 37°C con agitación ocasional. Después de 2 h, se colectó el tejido y el medio de cada pozo se transfirió a tubos de 1.5 ml que se centrifugaron a 1,000 x g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el tejido se lavó dos veces con PBS frío. Después de otra centrifugación a 1,000 x g por 5 minutos a 4°C el sobrenadante se descartó y al tejido se le añadió RIPA [25 mM Tris- HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS y la mezcla de inhibidores de proteasas complete (Cat. 11697498001, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)]. El tejido se homogenizó a 4°C con 30 golpes de un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón. Los homogenados se centrifugaron a 15,142 x g por 15 minutos y el sobrenadante se colectó y en seguida se cuantificó la concentración de proteínas que contenía. Las muestras posteriormente se procesaron por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 15%. Para realizar la inmunodetección se utilizaron anticuerpos específicos contra LC3-I y LC3-II y actina como control de carga.

5.14) Tratamiento de las ratas ZDF obesas con metformina

Se colocaron 12 ratas OZ y 6 ratas LZ de 6 semanas de edad en cajas individuales. Todos los animales tuvieron acceso libre a LabDiet 5008 y agua. Durante los 7 días de aclimatación se midió el consumo de agua. Una vez que las ratas alcanzaron las 7 semanas

de edad, a un grupo de 6 ratas OZ se le suplementó diariamente el agua para beber con 300mg/kg de metformina (Cat. D150959; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Esta dosis se eligió porque previamente se empleó para tratar la esteatosis hepática en las ratas Zucker obesas (Forcheron et al., 2009). Los grupos de 6 ratas LZ y 6 ratas OZ no tratados con metformina no cambiaron sus condiciones originales de vivienda. Se midió el peso de los animales de todos los grupos dos veces por semana (Fig. 10a).

Cuando las ratas alcanzaron las 12 semanas de edad, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa y tres días después se sacrificaron por dislocación cervical los animales previamente anestesiados con sevoflurano (3-5%). A través de una toracotomía se obtuvieron directamente del corazón las muestras de sangre. Se colocaron 400 µl de sangre en tubos tipo eppendorf y se centrifugaron a 3500 rpm. El sobrenadante se recuperó y se congeló a -20°C. Inmediatamente después de obtener las muestras de sangre, los hígados se extirparon, se pesaron (Fig.10b) y se perfundieron a través de la vena portal. Posteriormente, los hígados se procesaron para Western blot, microscopía electrónica e inmunofluorescencia.

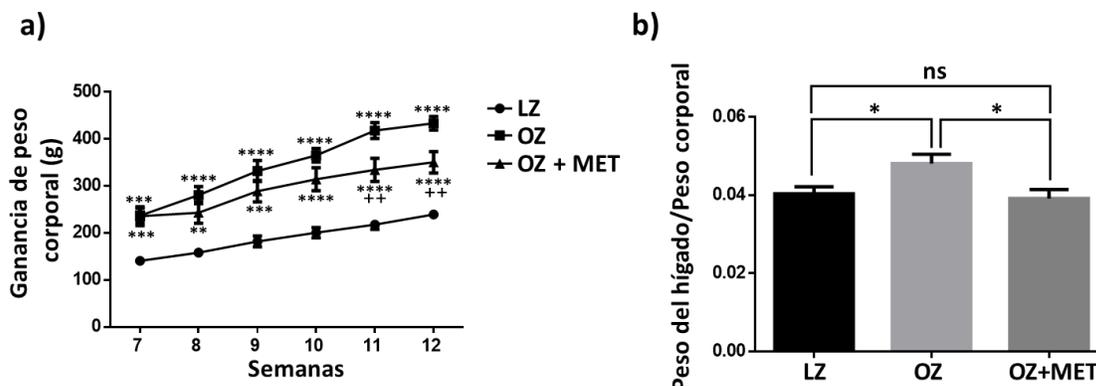


Figura 10. Peso corporal y del hígado de las ratas LZ y OZ tratadas o no con metformina. a) El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. *, análisis de las ratas LZ vs OZ y LZ vs OZ+metformina; +, análisis entre las ratas OZ vs OZ + metformina. b) El análisis estadístico se hizo con una ANOVA de una vía seguida de la prueba Fisher LSD. *p<0.05. ns, no significativo.

5.15) Cuantificación de ácidos biliares totales

La determinación cuantitativa *in vitro* de los ácidos biliares en el suero de las ratas LZ y OZ tratadas o no con metformina se realizó con el estuche Dyazyme Total Bile Acid (Cat.

DZ042A, Diazyme, Poway, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de sangre se obtuvieron directamente del corazón.

5.16) Permeabilidad del hígado al lantano determinada por microscopía electrónica

Para determinar la permeabilidad paracelular del hígado al lantano, se siguió un protocolo previamente descrito (Lora et al., 1997). En breve: los hígados se enjuagaron con solución fisiológica para eliminar los restos de sangre. Enseguida, se cortaron en fragmentos pequeños y se incubaron en una solución de perfusión/fijación de glutaraldehído 2.5%/nitrato de lantano 4% en solución amortiguadora de cacodilato 0.1 mol/L, pH 7.8. La solución de nitrato de lantano se preparó disolviéndolo en agua (8% wt/vol) a 65°C y diluyendo 1:1 con solución amortiguadora de cacodilato 0.2 mol/L, pH 7.8. Después de la perfusión y fijación, los fragmentos de hígado se enjuagaron por 30 minutos en solución amortiguadora de cacodilato 0.1 ml/L/nitrato de lantano 4% y se post fijaron en tetróxido de osmio 1% con nitrato de lantano al 4% por una hora a 4°C. Las muestras se deshidrataron en etanol y óxido de propileno. Enseguida, se embebieron en resina epóxica Polybed y se polimerizaron a 60°C por 24 horas. Posteriormente, se hicieron cortes finos de 60 nm que se tiñeron a temperatura ambiente por 20 minutos con acetato de uranilo y posteriormente con citrato de plomo por 2 minutos. Los cortes se examinaron en el microscopio de transmisión electrónica Jeol JEM-1011.

La permeabilidad de las UEs de los hepatocitos de las ratas LZ, OZ y OZ+MET se evaluó por la penetración de lantano, un marcador paracelular electrodenso (Lora et al., 1997). Las UEs previenen la difusión del lantano al canalículo biliar, por lo tanto, si este contiene partículas de lantano, se consideran permeables a las UEs.

VI) Resultados

6.1) ZO-2 se asocia con la cinasa LATS y favorece su concentración en el borde celular.

En las células MDCK, el silenciamiento de ZO-2 reduce la fosforilación de YAP (Dominguez-Calderon et al., 2016), el efector final de la ruta Hippo. Por ello ahora exploramos si ZO-2 se asocia a las proteínas de esta vía. Al inmunoprecipitar a ZO-2 de las células MDCK, no se detectó a la cinasa MST1/2 ni a su plataforma SAV, pero si a la cinasa LATS (Figs.11a y b). La interacción de ZO-2 con LATS1 se confirmó al inmunoprecipitar a LATS e inmunodetectar a ZO-2 (Fig. 11c).

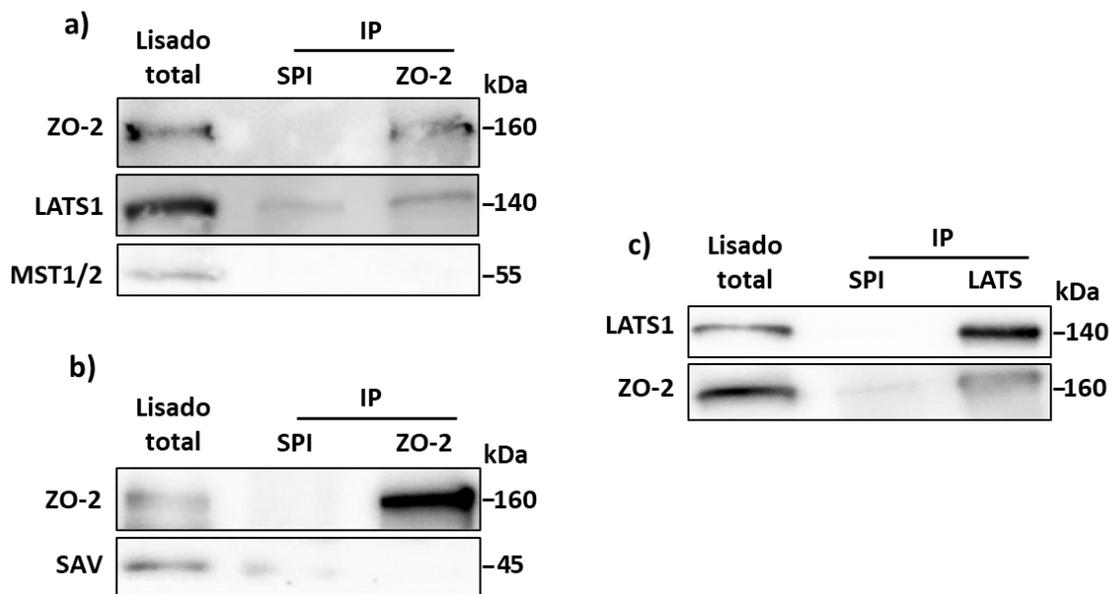


Figura 11. ZO-2 interactúa con la cinasa LATS1 pero no con MST ni SAV. (a y b) En las células MDCK parentales se inmunoprecipitó a ZO-2 y se inmunodetectó a ZO-2, LATS, MST1/2 y SAV. En el inmunoprecipitado de LATS se detectó a ZO-2.

Para verificar la interacción de ZO-2 con LATS1 se realizó un ensayo de arrastre en las células de riñón HEK293T. Elegimos esta línea celular porque en ella es mayor la eficiencia de transfección que en las células MDCK. En este ensayo las células HEK293T se transfectaron con los segmentos amino (dominios PDZ 1-3), 3PSG (dominios PDZ3, SH3 y GUK) o AP (región ácida y rica en prolinas) de cZO-2, presentes en el vector pcDNA4/HisMax. Las proteínas correspondientes presentes en los lisados totales se purificaron en columnas con perlas de sefarosa recubiertas de níquel, ya que este es afín a

la bandera de 6 histidinas que contienen los péptidos amino, 3PSG y AP de ZO-2. Después de varios lavados y de eluir a las proteínas asociadas con imidazol que tiene mayor afinidad por el níquel que la histidina, el eluato se corrió en una electroforesis y los segmentos amino, 3PSG y carboxilo se detectaron con un anticuerpo anti-histidina que reveló las bandas de 62, 53 y 45 kDa que corresponden respectivamente a los tres segmentos de cZO-2 (Fig. 12). La identidad de los segmentos amino y carboxilo de ZO-2 se confirmó con anticuerpos anti-ZO-2 que reconocen específicamente estas secciones de la proteína, como lo indican los fabricantes. Sin embargo, esto no se pudo hacer con el segmento 3PSG de ZO-2 ya que no existe un anticuerpo comercial que lo reconozca. El Western blot reveló la presencia de LATS1 en los ensayos de arrastre hechos con los tres segmentos de ZO-2. Sin embargo, la banda de LATS1 es más intensa en el arrastre con el segmento AP de ZO-2, lo cual indica que LATS1 se asocia con fuerza a este segmento. En conjunto, los resultados de la inmunoprecipitación y el arrastre indican que ZO-2 interactúa con LATS1, una cinasa clave de la vía Hippo.

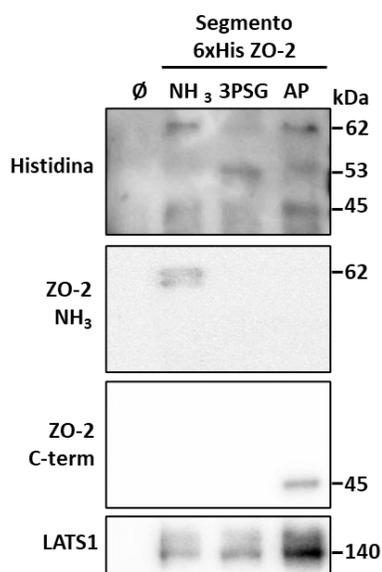


Figura 12. ZO-2 se une a LATS1 a través de la región AP. Western Blot del ensayo de arrastre de los segmentos amino, 3PSG y AP de cZO-2. Primer panel, el anticuerpo anti histidina reconoce las bandas de 62, 53 y 45 kDa que corresponden respectivamente al peso molecular esperado de los segmentos amino, 3PSG y AP de ZO-2. Segundo panel, el anticuerpo contra el segmento amino de ZO-2 reconoce a la banda de 62 kDa presente en el ensayo de arrastre del segmento amino de ZO-2. Tercer panel, el anticuerpo contra el segmento c-terminal de ZO-2 reconoce la banda de 45 kDa presente en el ensayo de arrastre del segmento AP de ZO-2. Cuarto panel, el anticuerpo contra LATS1 da una señal fuerte en el ensayo de arrastre del segmento AP de ZO-2.

En seguida, exploramos si la ausencia de ZO-2 afecta la localización de LATS1. Por inmunofluorescencia (IF) observamos que en las células parentales MDCK, LATS fosforilada (S909) y activa se localiza en el borde celular mientras que en las células ZO-2 KD disminuye su expresión (Fig. 13). Desafortunadamente no pudimos analizar la distribución total de LATS1 debido a que los anticuerpos contra esta proteína no funcionan para inmunofluorescencia (datos no mostrados).

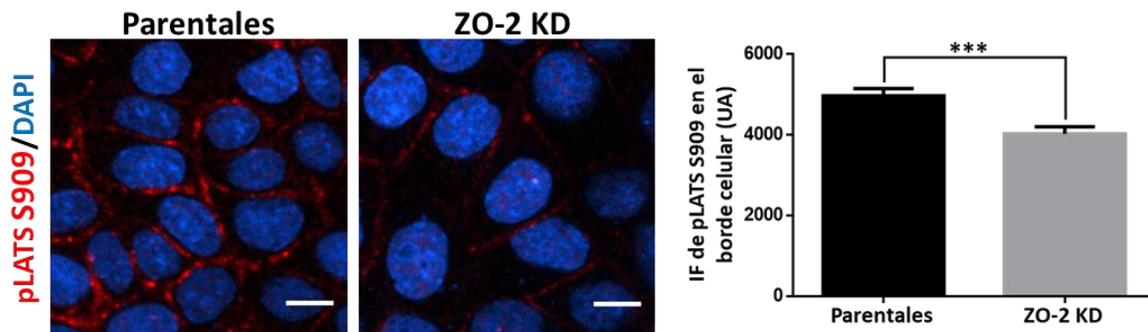


Figura 13. En ausencia de ZO-2 disminuye la expresión de pLATS en el borde celular. Inmunofluorescencia de LATS activa (pLATS S909, rojo) en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Barra, 10 μ M. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de pLATS S909 en el borde celular realizado con imágenes obtenidas de tres experimentos independientes. UA, unidades arbitrarias. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar (ES). El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student; *** p <0.001.

Por Western blot observamos que el cociente de pLATS/LATS1 disminuye en las células ZO-2 KD y aumenta en las células transfectadas con hZO-2 no susceptible al shARN contra ZO-2 (Fig. 14). Estos resultados indican que ZO-2 promueve la localización y activación de LATS1 en el borde celular. No analizamos la expresión y localización de LATS2 debido a que los anticuerpos comerciales no detectan a LATS2 en las células MDCK (Fig. 15).

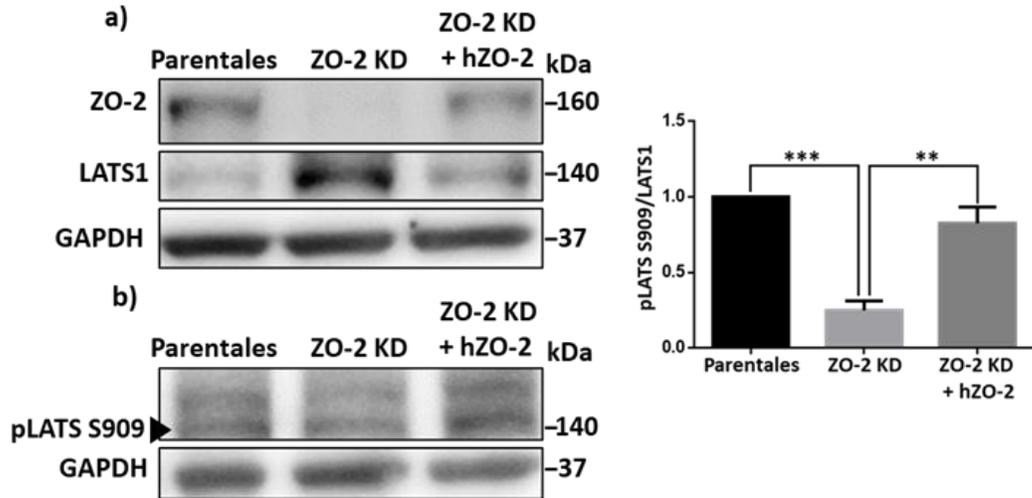


Figura 14. En ausencia de ZO-2 aumenta la expresión de LATS y disminuye LATS fosforilada en la S909. Western blot de LATS (a) y pLATS S909 (cabeza de flecha) (b) en las células MDCK parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con la construcción hZO-2 no susceptible al shARNs contra ZO-2. Se utilizó a GAPDH como control de carga. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo de tres experimentos independientes. Cada barra muestra el promedio \pm ES. Los datos de las células parentales se normalizaron a 1. El análisis estadístico se hizo con Anova de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

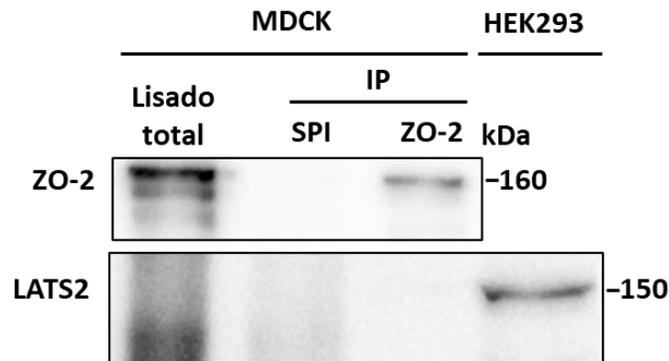


Figura 15. LATS2 se detecta en las células HEK293 pero no en las MDCK. Western blot de LATS2 en las células MDCK parentales y HEK293, y en un inmunoprecipitado de ZO-2 derivado de células MDCK parentales. ZO-2 se detectó como control. SPI, suero pre-inmune.

Previamente se demostró que en el riñón remanente de una rata uninefrectomizada la expresión de ZO-2 disminuye y la cantidad de YAP nuclear aumenta (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por lo tanto, ahora analizamos si la concentración de LATS1/2 fosforilada cambia después de una UNX. Encontramos que después de 3 semanas de una UNX disminuye la cantidad de LATS fosforilada en el riñón remanente (Fig.16).

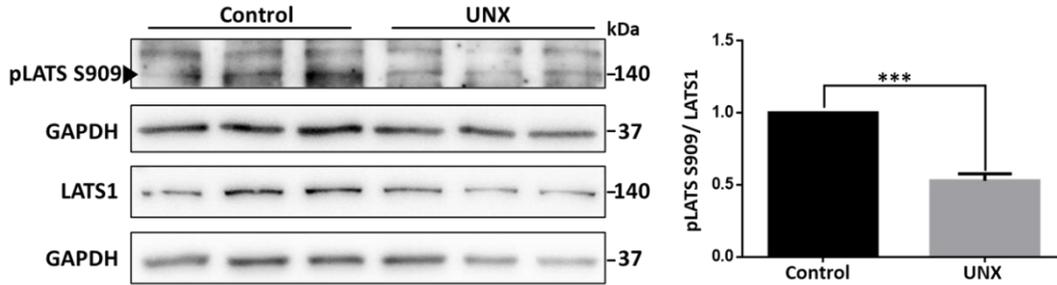


Figura 16. En el riñón hipertrófico de la rata uninefrectomizada disminuye la fosforilación de LATS. Detección por Western blot de LATS1 y pLATS S909 (cabeza de flecha) en lisados de riñón derivado de ratas de 11 semanas nefrectomizadas unilateralmente o sometidas a una cirugía simulada (control) a las 8 semanas de vida y sacrificadas 3 semanas después. Se utilizó GAPDH como control de carga. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los datos de los riñones control se normalizaron a 1. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student; *** $p < 0.001$.

Estos resultados sugieren que la interacción con ZO-2 favorece la fosforilación de LATS en las células epiteliales renales *in vivo* e *in vitro*.

6.2. La expresión de ZO-2 se regula a nivel transcripcional por Sp1 en las células renales.

La expresión de ZO-2 disminuye en el riñón remanente de la rata después de una UNX (Dominguez-Calderon et al., 2016). Ahora exploramos por qRT-PCR si este efecto se debe a la disminución del ARNm de ZO-2. En la figura 17 se muestra que la cantidad del ARNm de ZO-2 presente en los riñones remanentes de la UNX disminuye un 36% en comparación con los riñones provenientes de ratas con una operación simulada (control).

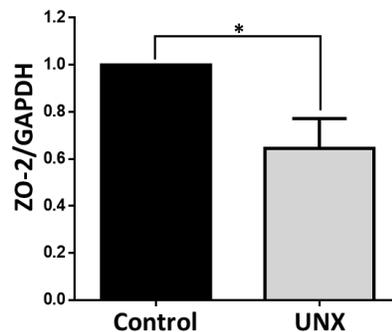


Figura 17. En el riñón remanente de rata uninefrectomizada disminuye el ARNm de ZO-2. Amplificación por qRT-PCR del ARNm de ZO-2 en riñones de ratas que tres semanas antes fueron sometidas a una operación simulada (control) o una UNX. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los datos control se normalizaron a 1. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student; * $p < 0.05$. GAPDH se amplificó como control.

En humanos, los promotores alternativos P_A y P_C dirigen la transcripción del ARNm de ZO-2 que origina respectivamente a las isoformas ZO-2A y ZO-2C que se expresan en las células no cancerosas (Chlenski et al., 1999). El promotor P_A del gen *TJP2* se regula por 27 sitios Sp1 y 6 sitios Zeste (Chlenski et al., 1999). Sp1 es un factor de transcripción ubicuo que funciona como activador transcripcional de una gran variedad de genes incluyendo genes constitutivos, reguladores del ciclo celular y específicos de un tejido [Para una revisión ver (O'Connor et al., 2016)]. Por estos antecedentes, en seguida analizamos la expresión del factor de transcripción Sp1 en las células de los túbulos renales de ratas control y UNX. Se hizo un fraccionamiento celular de riñón y se observó que la cantidad de Sp1 disminuye en la fracción nuclear después de una UNX en comparación con la condición control (Fig. 18).

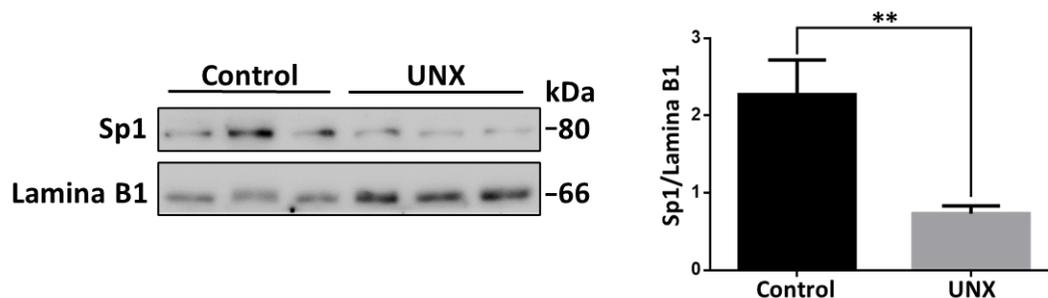


Figura 18. En el riñón remanente de las ratas uninefrectomizadas disminuye la expresión del factor de transcripción Sp1. Western blot de Sp1 presente en la fracción nuclear derivada de riñones de ratas con una cirugía simulada (control) o con una UNX. Se utilizó lamina B1 como control de carga. Panel izquierdo, imagen representativa; panel derecho, análisis densitométrico. Cada barra muestra el promedio ± ES de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student, ***p* = 0.0074.

Para probar la importancia de Sp1 en la transcripción de ZO-2, en las células MDCK se indujo la formación de la UE en presencia del inhibidor de Sp1, mitramicina (MTM) (Sleiman et al., 2011). Para ello, las monocapas de células MDCK cultivadas durante 24 horas en medio con calcio normal (CN, 1.8 mM Ca²⁺) se transfirieron por una hora a medio con bajo calcio (BC, 1-5 μM Ca²⁺) y 2 mM de EGTA, con el fin de provocar el desensamble y la endocitosis de la UE, como se reportó previamente (Martinez-Palomo et al., 1980). En seguida, las monocapas se transfirieron a medio CN para inducir la formación *de novo* de la UE en presencia o ausencia de MTM 400 nM. La figura 19a muestra que en las monocapas

incubadas con MTM no se incrementó la expresión de ZO-2 después de que las monocapas se transfirieron de BC a CN. En seguida, se analizó por qRT-PCR el ARNm de ZO-2, observándose que en las células cultivadas en la condición de BC, la cantidad de ARNm alcanza valores más altos que en las células que se mantuvieron en CN, como previamente se había reportado para el ARNm de ZO-1 (Gonzalez-Mariscal et al., 1999) (Fig. 19b). Además, se vio que el tratamiento con MTM inhibe el incremento del ARNm de ZO-2 que se observa en la condición de BC. Estos resultados indican que en las células MDCK el factor de transcripción Sp1 regula la transcripción de ZO-2.

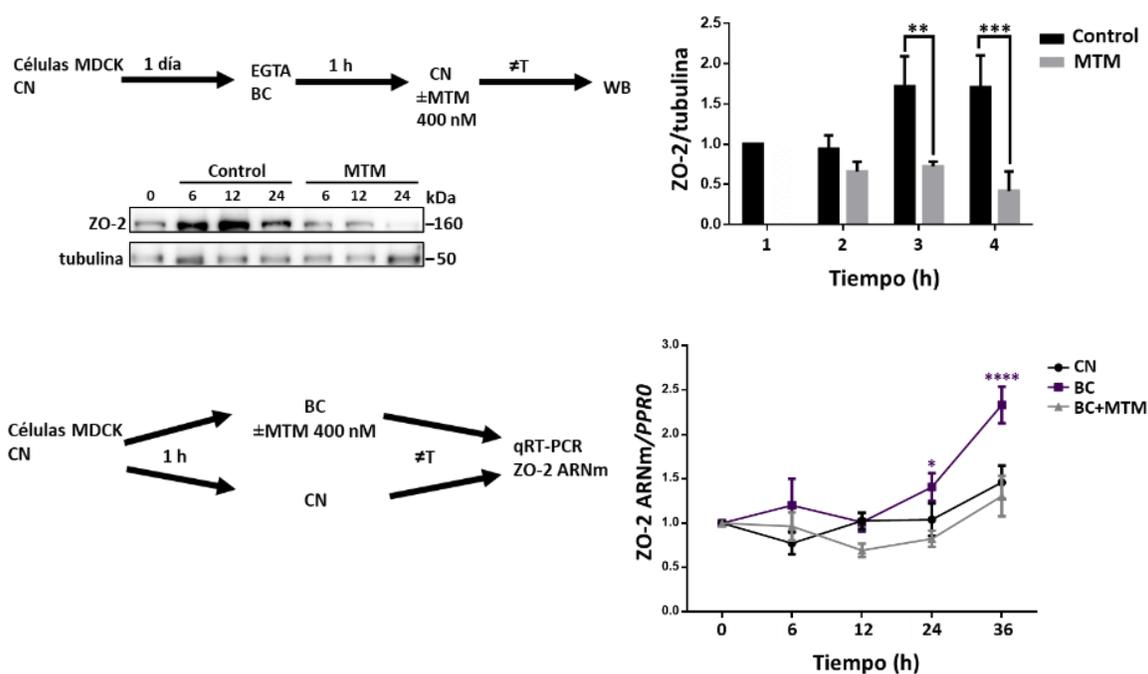


Figura 19. En las células MDCK, la inhibición del factor de transcripción Sp1 bloquea la expresión de la proteína y el ARNm de ZO-2. (a) El incremento en la expresión de ZO-2 que se observa en las células MDCK que se transfirieron de medio con bajo calcio (BC, 1.5 μM Ca^{2+}) y 2 mM de EGTA a medio con calcio normal (CN, 1.8 mM Ca^{2+}) para inducir la síntesis y el ensamblaje de las proteínas de las UEs, no se presenta cuando las células se incuban con mitramicina 400 nM. Panel izquierdo, esquema del procedimiento experimental y western blot representativo de tres experimentos independientes; panel derecho, análisis densitométrico. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. El valor del control al tiempo 0 se normalizó a 1. El análisis estadístico se hizo con una Anova de dos vías, seguida de una prueba LSD de Fisher; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (b) Cuantificación del ARNm de ZO-2 por RT-qPCR en monocapas cultivadas en medio CN o BC sin y con MTM 400 nM. Panel izquierdo, esquema del procedimiento experimental; panel derecho, cantidad del ARNm de ZO-2. Los resultados se presentan como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los datos se normalizaron contra los valores de CN a tiempo 0. El análisis estadístico se realizó con una Anova de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples de Tukey; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

Para comprobar estos resultados, analizamos por IF la expresión de Sp1 en monocapas de células MDCK que se incubaron durante 24 o 36 horas en medio con CN y BC. La figura 20 muestra que en ambos tiempos la expresión de Sp1 es mayor en la condición de BC que en CN. Esto concuerda con el incremento en la expresión del ARNm de ZO-2 que encontramos en la condición de BC.

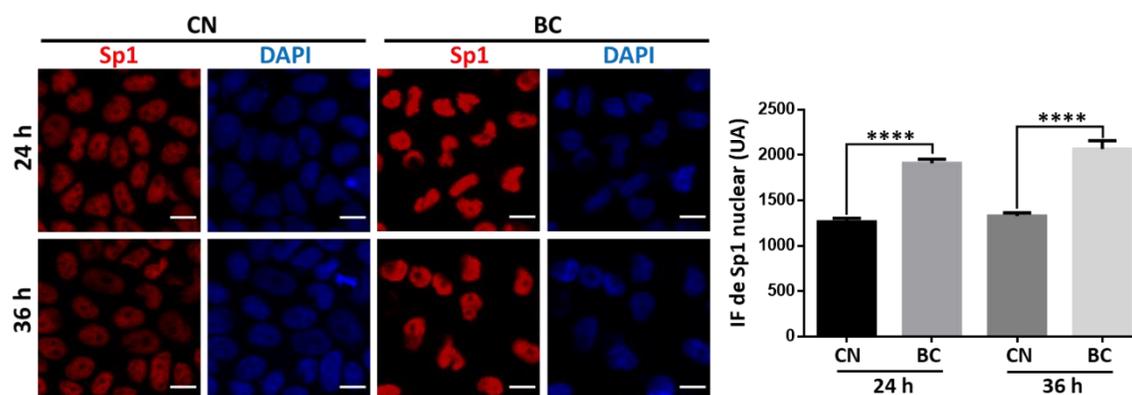


Figura 20. En las células MDCK incubadas durante 24 y 36 horas en medio BC aumenta la concentración nuclear de Sp1. Inmunofluorescencia de Sp1 en el núcleo de las células MDCK después de 24 y 36 horas de incubación en medios CN y BC. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra, 10 μ M. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de Sp1 en el núcleo. Se cuantificaron 190 núcleos provenientes de al menos tres experimentos independientes por condición. UA, unidades arbitrarias. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar (ES). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; **** $p < 0.0001$.

Después, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de Sp1 en las células MDCK parentales y ZO-2 KD, observando que en ausencia de ZO-2 aumenta la expresión de Sp1 nuclear (Fig 21). Estos resultados sugieren que en las células ZO-2 KD la presencia del shARN que promueve la degradación o inhibe la traducción del ARNm de ZO-2, induce un mecanismo que aumenta la expresión de Sp1.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que Sp1 regula la transcripción de ZO-2 en las células renales.

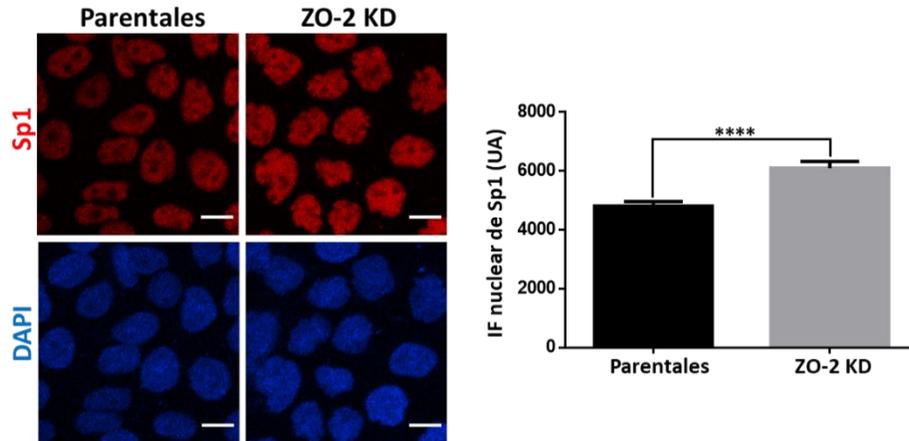


Figura 21. En las células MDCK ZO-2 KD aumenta la concentración nuclear del factor de transcripción Sp1. Inmunofluorescencia de Sp1 en el núcleo de las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra, 10 μ m. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, cuantificación de la fluorescencia de Sp1 en el núcleo. Se cuantificaron 100 núcleos por condición provenientes de tres experimentos independientes. UA, unidades arbitrarias. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar (ES) El análisis estadístico se realizó con la prueba Mann Whitney; ****p<0.0001.

6.3) El silenciamiento de ZO-2 en el riñón después de una UNX no se regula por los miARNs 23a, 23b, 124 o 137.

En seguida, analizamos si el silenciamiento de ZO-2 después de una UNX se regula por miARNs. Estos son pequeños ARNs endógenos no codificantes de 20-25 nucleótidos que tras asociarse a la proteína argonata, se dirigen a la región 3' no traducida (3'UTR) de los ARNs mensajeros blanco donde promueven su represión traduccional y degradación. Los miARNs regulan la expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario y diversas funciones celulares, y su desregulación puede iniciar o propagar diversas enfermedades, incluyendo al cáncer [Para revisión ver (Gebert and MacRae, 2019)].

El análisis *in silico* hecho con TargerScan (www.trargetscan.org) reveló que la región 3'UTR del ARNm de ZO-2 de rata, ratón, perro y humano tiene sitios blanco conservados para los miRs-23a y b, y el miR-124, mientras que el sitio blanco para el miR-137 no se conserva en perro (datos no mostrados). Aunque los miRs 23a y 23b difieren únicamente por 1 nucleótido (g19) fuera de la región de unión al ARNm blanco, sus efectos son contrarios ya que mientras que el a inhibe la permeabilidad endotelial, el b la incrementa

(Li et al., 2016). Así mismo, el miR-137 bloquea la expresión de ZO-2 e incrementa la permeabilidad de las células de la microvasculatura cerebral (Yu et al., 2017). En cambio, el miR-124 funciona como un supresor tumoral y presenta un polimorfismo que se asocia al riesgo y a las características clinicopatológicas del cancer colorectal (Gao et al., 2015).

Evaluamos por qRT-PCR la expresión de los miRs -23a, -23b y -124 y no detectamos diferencia alguna entre los riñones de ratas control y uninefrectomizadas (Fig. 22), y con respecto al miR-137, no se detectó su presencia en el riñón de rata (dato no mostrado). En conjunto estos resultados indican que el silenciamiento de ZO-2 en el riñón de rata después de una UNX se debe a la inhibición transcripcional ocasionada por la disminución del factor de transcripción Sp1 y no por represión traduccional inducida por los miRs -23a, -23b, -124 o -137.

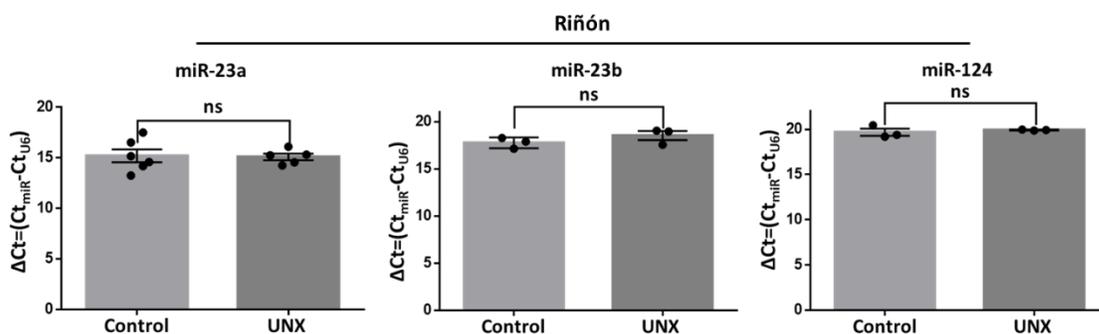


Figura 22. La UNX no altera la expresión de los miRs -23a, -23b y -124 que se dirigen contra el extremo 3'UTR del ARNm de ZO-2. Análisis por RT-qPCR de los miRs -23a, -23b y -124 en los riñones remanentes de ratas después de 3 semanas de UNX una operación simulada (control). Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. ns, no significativo.

6.4) En los hepatocitos de la rata Zucker obesa la expresión de ZO-2 disminuye y YAP se concentra en el núcleo.

Para determinar si el silenciamiento de ZO-2 es un rasgo común de las células hipertróficas o algo específico de la hipertrofia renal, se analizó por IF la expresión de ZO-2 en el hígado de las ratas Zucker obesas (OZ) de 12 semanas. Como control, se usaron ratas Zucker delgadas (LZ) de la misma edad. En el hígado de las ratas LZ, ZO-2 se observa de dos maneras: como un par de puntos que limitan la membrana apical en los extremos de la luz del canalículo biliar formado por dos hepatocitos adyacentes; y como una vía de tren que

delinea al canalículo intrahepático (Figs.23a y b), tal como se reportó para otras proteínas de la UE en el hígado (Stevenson et al., 1986). En el hígado de las ratas OZ disminuye la expresión de ZO-2 (Figs. 23a y b). ZO-1 y ZO-2 funcionan como plataformas redundantes para la polimerización de las claudinas en la membrana plasmática (Umeda et al., 2006), por ello también analizamos si la expresión de ZO-1 se altera. Encontramos que en el hígado de las ratas OZ aumenta la expresión de ZO-1 con respecto a las ratas LZ (Figs 23c y d).

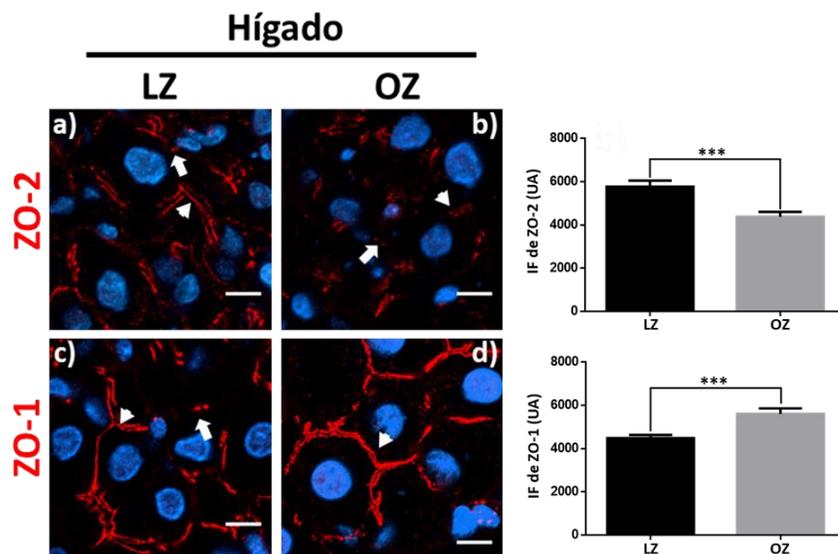


Figura 23. En el hígado de la rata OZ con esteatosis disminuye la expresión de ZO-2 y aumenta la de ZO-1. Detección por inmunofluorescencia de ZO-2 (a y b) y ZO-1 (c y d) en cortes congelados de hígado provenientes de ratas Zucker delgadas (LZ) y obesas (OZ) de 12 semanas de edad. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra, 10 μ M. El patrón característico de “vías de tren” se indica con cabezas de flechas y el par de puntos se marca con flechas. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo. UA, unidades arbitrarias. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar (ES). El análisis estadístico se realizó con la prueba Mann Whitney; **** $p < 0.0001$.

La disminución de la expresión de ZO-2 en el hígado con esteatosis se confirmó con un Western blot contra ZO-2, hecho con lisados de hígado derivados de ratas LZ y OZ (Fig. 24). El silenciamiento de ZO-2 se regula a nivel transcripcional, pues en el hígado de la rata OZ disminuye la cantidad de ARNm de ZO-2 (Fig. 25) y la concentración nuclear de Sp1 en comparación con la rata LZ (Figura 26).

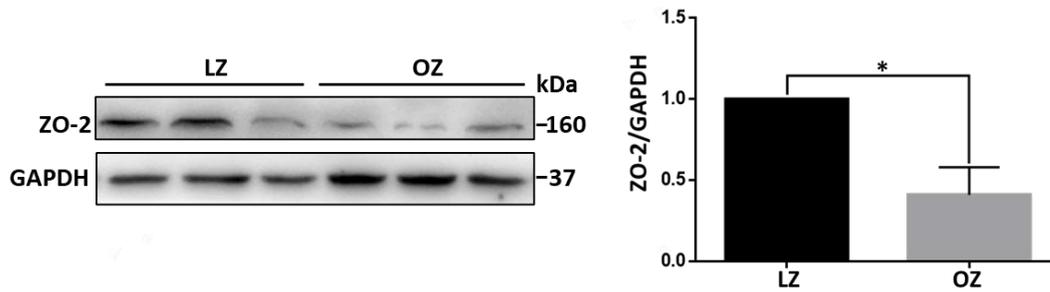


Figura 24. En el hígado de la rata Zucker obesa con esteatosis disminuye la expresión de ZO-2. Western blot de ZO-2 en lisados de hígado de ratas OZ y LZ. Panel izquierdo, Western blot representativo; panel derecho, análisis cuantitativo. Las barras muestran el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student, * $p < 0.03$.

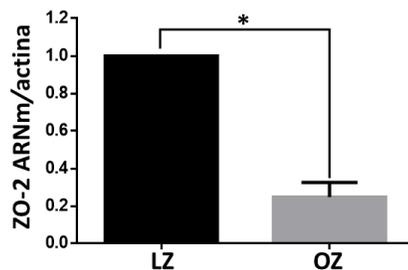


Figura 25. En el hígado de la rata OZ con esteatosis disminuye el ARNm de ZO-2. Amplificación por qRT-PCR del ARNm de ZO-2 en el hígado de las ratas LZ y OZ. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los datos de las ratas LZ se normalizaron a 1. El análisis estadístico se realizó con una prueba *t* de Student; * $p < 0.05$. La actina se amplificó como control.

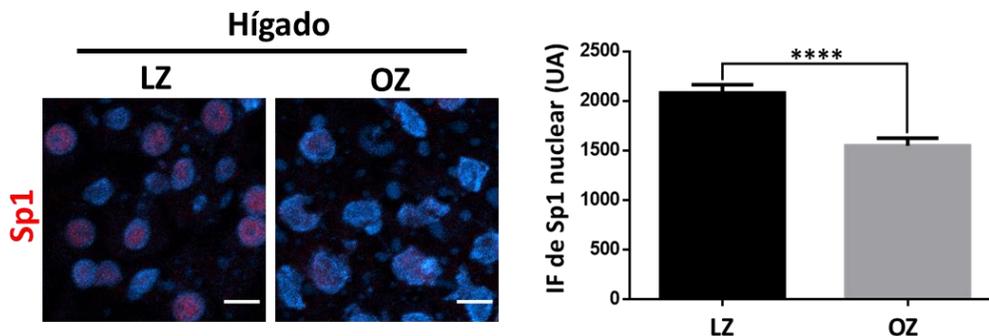


Figura 26. En el hígado de la rata OZ disminuye la concentración nuclear de Sp1. Inmunofluorescencia de Sp1 en cortes congelados de hígado de ratas LZ y OZ de 12 semanas de edad. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra, 10 μ M. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo de la fluorescencia de Sp1 en el núcleo. Se cuantificaron 200 núcleos por condición. UA, unidades arbitrarias. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar (ES). El análisis estadístico se realizó con la prueba Mann Whitney; **** $p < 0.0001$.

Previamente se reportó que en el riñón remanente de rata después de una UNX, el silenciamiento de ZO-2 correlaciona con un incremento de YAP nuclear (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por lo tanto, analizamos por inmunofluorescencia si en el hígado de la rata OZ, la disminución de ZO-2 promueve la localización nuclear de YAP. Como se observa en la figura 27 en el hígado de las ratas OZ, YAP se acumula en el núcleo en comparación con las ratas LZ. Estos resultados indican que el silenciamiento de ZO-2 y la acumulación nuclear de YAP, son características comunes de los órganos hipertróficos.

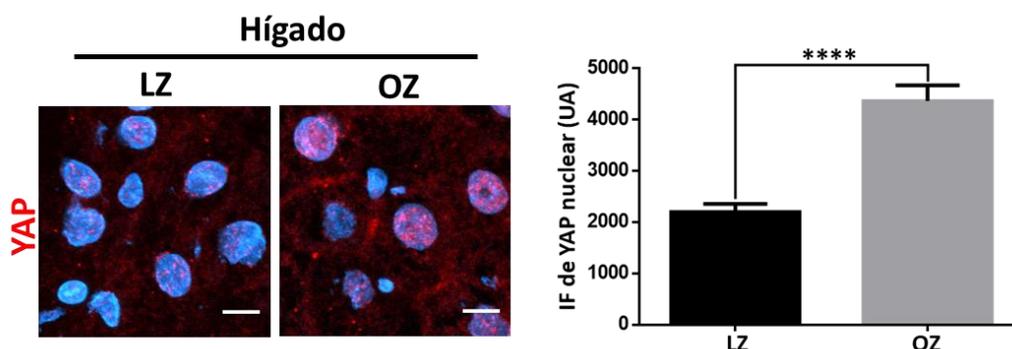


Figura 27. YAP se concentra en el núcleo de los hepatocitos de la rata OZ. Inmunofluorescencia de YAP en cortes congelados provenientes de ratas LZ y OZ de 12 semanas de edad. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra, 10 μ M. Panel izquierdo, imágenes representativas; panel derecho, análisis cuantitativo de la fluorescencia de YAP en el núcleo. Se cuantificaron 100 núcleos por condición. UA, unidades arbitrarias. El análisis estadístico se realizó con la prueba Mann Whitney; **** $p < 0.0001$.

6.5) La esteatosis en el hígado de las ratas OZ correlaciona con una alteración de la actividad del autolisosoma.

En el modelo de UNX, Yap induce hipertrofia renal a través de la activación de mTOR, que fosforila a la $p_{70}S6$ kinasa (S6K) (Dominguez-Calderon et al., 2016) que a su vez fosforila a S6, un componente de la subunidad 40S ribosomal. Tanto S6K (Montagne et al., 1999; Ohanna et al., 2005; Shima et al., 1998) como S6 (Ruvinsky et al., 2005) son reguladores críticos del tamaño celular. Por esta razón ahora analizamos si en el hígado hipertrófico de las ratas OZ se altera la fosforilación de S6K y S6. En la figura 28 se observa que no hay diferencia en la expresión o fosforilación de $p_{70}S6K$ presente en el hígado de las ratas OZ y LZ. En cambio, sí disminuye la fosforilación de S6 en las ratas OZ. Estos resultados son contrarios a lo observado en el riñón hipertrófico e indican que en el hígado de las ratas OZ, la hipertrofia no se debe a la activación de la ruta mTOR/S6K/S6.

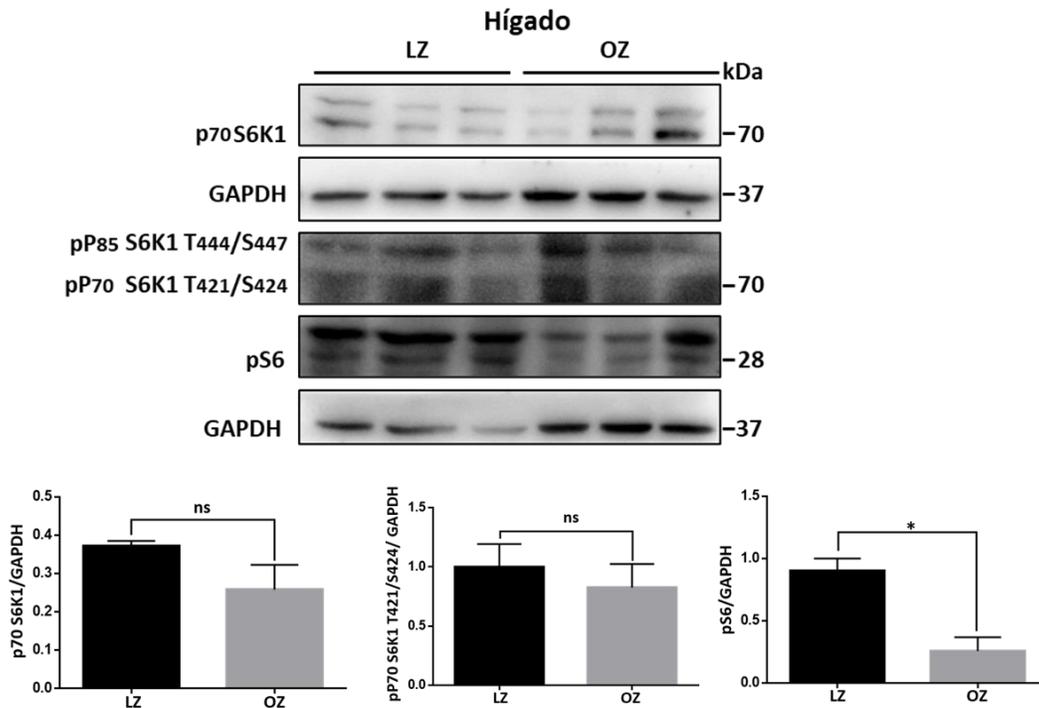


Figura 28. En el hígado de la rata OZ disminuye la fosforilación de S6. Western blot de S6 fosforilada, p70S6K1 y p70S6K1 fosforilada en T421/S424 y T444/S447 en lisados de hígado de ratas LZ y OZ. Panel superior, Western blot representativo; panel inferior, análisis cuantitativo. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba *t* de Student, * $p < 0.02$; ns, no significativo.

La hipertrofia se desencadena por el desequilibrio entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas. Por ello, la alcalinización lisosomal al reducir la degradación de las proteínas induce hipertrofia (Jurkovitz et al., 1992; Ling et al., 1996). Como vimos que en el hígado de la rata OZ la hipertrofia no se debe a la activación de la ruta mTOR/S6K/S6 que promueve la síntesis de proteínas, ahora analizamos en los hepatocitos la funcionalidad del lisosoma. Para ello empleamos el ensayo *ex vivo* del flujo de LC3. LC3-I es una proteína que al conjugarse con fosfatidiletanolmina (PE) forma a LC3-II que se asocia a la membrana del fagóforo en extensión y se mantiene presente en el autofagosoma y en los autolisosomas maduros. Sin embargo, tras la fusión del autofagosoma con el lisosoma, el contenido luminal de LC3-II se degrada. Por lo tanto, si la actividad del lisosoma disminuye, se bloquea la degradación de LC3-II y aumenta en consecuencia el cociente LC3-II/LC3-I [para una revisión ver (Rubinsztein et al., 2009)].

El ensayo de flujo de LC3 se realizó en rebanadas de hígado provenientes de ratas OZ y LZ con 24 horas de ayuno, porque en esta condición aumenta la degradación de proteínas por autofagia (Ezaki et al., 2011). Para disminuir el flujo autofágico usamos NH_4Cl 100 mM que incrementa el pH lisosomal e inhibe la fusión del lisosoma con el autofagosoma. En la figura 29 se muestra como se esperaba, que en el hígado de las ratas LZ, el NH_4Cl incrementa el cociente LC3-II/LC3-I ya que disminuye la degradación de LC3-II. Sin embargo, este efecto no se observa en las ratas OZ tratadas con NH_4Cl .

Estos resultados indican que en el hígado de las ratas OZ en comparación con los animales LZ, disminuye la actividad de los lisosomas, lo que favorecería el desarrollo de la hipertrofia hepática.

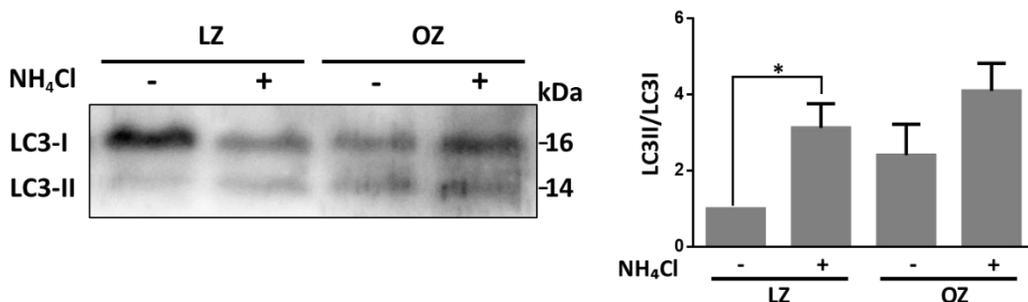


Figura 29. El ensayo de flujo de LC3-II revela que en el hígado de las ratas OZ los autofagosomas no funcionan adecuadamente. Las rebanadas de hígado derivadas de ratas OZ y LZ sujetas a 24 horas de ayuno, se trataron o no con NH_4Cl 100 nM para neutralizar el pH lisosomal y bloquear la degradación de LC3-II. El nivel de LC3-I y LC3-II se evaluó por Western blot. Panel superior, Western blot representativo de tres experimentos independientes; panel inferior, análisis cuantitativo. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los valores de LZ sin NH_4Cl se normalizaron a 1. El análisis estadístico se realizó con una Anova de dos vías, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey; * $p < 0.05$.

6.6) En el hígado de las ratas OZ, la activación de la AMPK con metformina aumenta la expresión de ZO-2 y pLATS y disminuye la concentración nuclear de YAP.

Para probar la importancia del silenciamiento de ZO-2 en la aparición de UEs permeables en el hígado con esteatosis, diseñamos una estrategia de re-expresión de ZO-2. Para ello, activamos a la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), ya que en trabajos previos se demostró que su activación promueve la polarización de las células (Baas et al., 2004) y el ensamble de la UE (Zhang et al., 2006) (Zheng and Cantley, 2007) y en particular,

induce en las células MDCK cultivadas en bajo calcio, la re-localización de ZO-2 del citoplasma al borde celular (Amaya et al., 2019). Por lo tanto, tratamos a las ratas OZ de 7 semanas de edad con metformina, un antidiabético que activa a la AMPK de los hepatocitos (Zhou et al., 2001). Administramos diariamente una dosis de 300 mg/kg de metformina hasta que los animales alcanzaron las 12 semanas de edad y se sacrificaron. Por inmunofluorescencia observamos que en el hígado de las ratas OZ tratadas con metformina, la tinción de ZO-2 es similar a la encontrada en las ratas LZ y es más conspicua y continua en los canalículos intrahepáticos en comparación a lo observado en las ratas OZ (figura 30a-c). Por Western blot encontramos que en el hígado de las ratas OZ tratadas con metformina incrementa la expresión de ZO-2 en comparación con los animales OZ y LZ (Fig. 31a).

Debido a que YAP se acumula en el núcleo de los hepatocitos de las ratas OZ (Fig. 27), ahora probamos si este efecto puede revertirse con el tratamiento con metformina. La figura 30d-f muestra que en las ratas OZ la activación de la AMPK con metformina disminuye la acumulación nuclear de YAP. Esta observación aunada a la interacción de ZO-2 y LATS1 (Fig. 11), nos llevaron a evaluar la expresión de la cinasa LATS activa en el hígado con esteatosis. Por Western blot (Fig. 31b) observamos que en el hígado de las ratas OZ disminuye la cantidad de pLATS en comparación con las ratas LZ, y que la expresión se recupera después del tratamiento con metformina.

Estos resultados indican que el silenciamiento de ZO-2 en el hígado hipertrófico correlaciona con la inactivación de la cinasa LATS y la consecuente acumulación nuclear de YAP, y que este proceso se puede revertir al activar a la AMPK con metformina.

6.7) En las ratas OZ el tratamiento con metformina restaura la expresión de la claudina-1, disminuye la permeabilidad paracelular de los hepatocitos y el contenido de sales biliares en el suero.

La colestasis intrahepática familiar progresiva (CIPF) tiene diferentes etiologías genéticas que incluyen a la CIPF tipo 4, caracterizada por mutaciones homocigotas (Sambrotta and Thompson, 2015) (Vij et al., 2017) y heterocigotas compuestas en *TJP2* (Ge

et al., 2019) (Zhou et al., 2015), el gen que codifica para ZO-2. En la CIPF-4 las mutaciones en *TJP2* generan codones de terminación prematura que generan la ausencia de ZO-2 y en consecuencia una reducción significativa de claudina-1 pero no de claudina-2 en el hígado (Sambrotta et al., 2014). Por lo tanto, en seguida examinamos si en las ratas OZ la reducción de ZO-2 en el hígado se acompaña de cambios en la expresión de las claudinas 1 y 2. Por inmunofluorescencia se observó que disminuye la expresión de claudina-1 en el hígado de las ratas OZ en comparación con las ratas LZ y que esta disminución se revierte después del tratamiento con metformina (Fig. 30g-i). En cambio, no se observó una alteración en la expresión de claudina-2 (Fig 30j-l). Estas observaciones se confirmaron por Western blot (Figs. 31c y d).

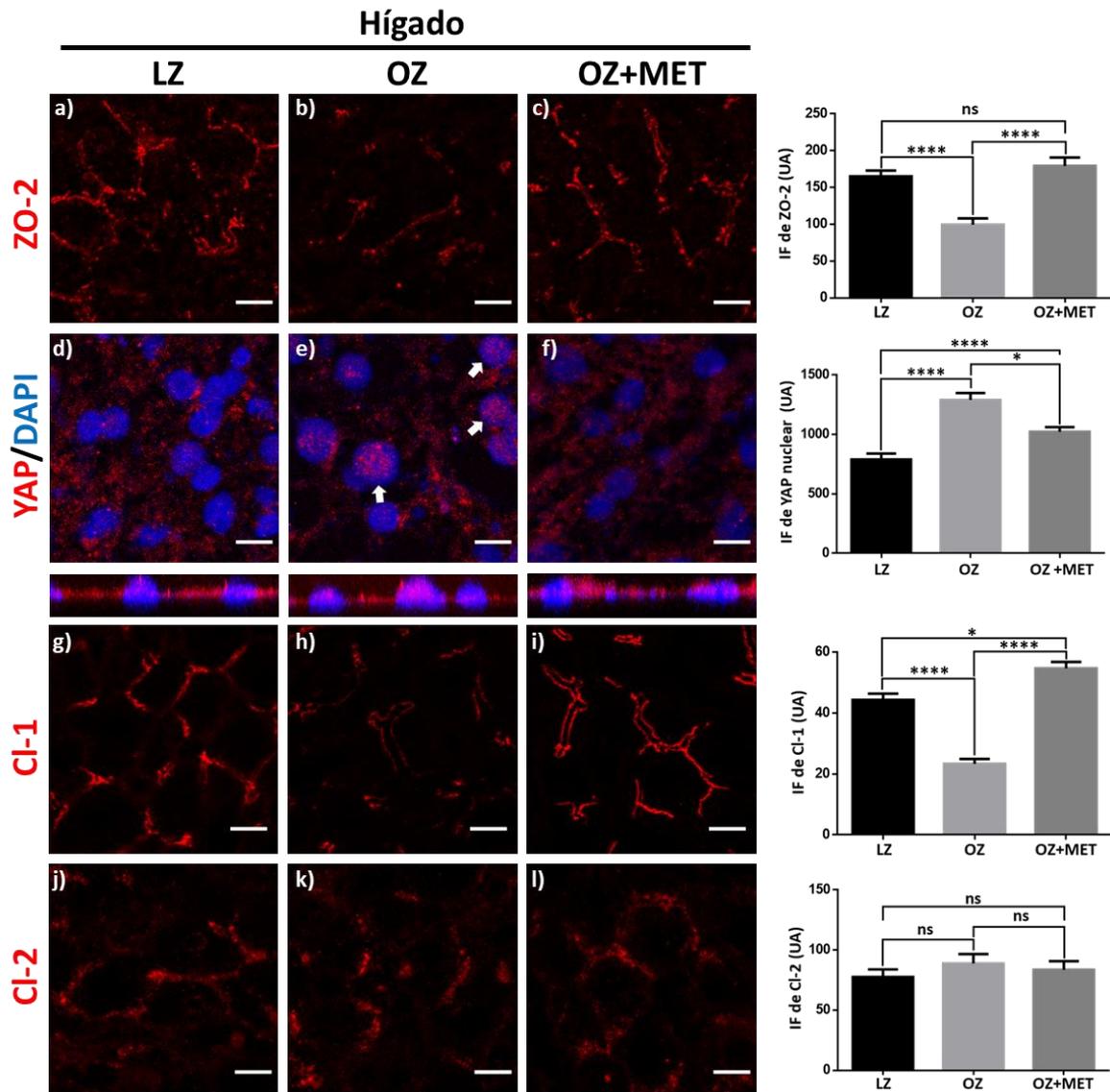


Figura 30. El tratamiento de las ratas OZ con metformina restaura en el hígado la expresión de ZO-2 y claudina-1 y promueve la salida de YAP del núcleo. Las ratas OZ de 7 semanas de edad se trataron o no ratas con metformina (MET) (300 mg/kg/día) hasta que alcanzaron las 12 semanas de edad y se sacrificaron junto con ratas LZ de la misma edad. Se utilizaron 3 ratas por condición experimental. Se extrajeron los hígados y se procesaron para inmunofluorescencias con anticuerpos específicos contra ZO-2 (a-c), YAP (d-f) y claudinas -1(g-i) y -2 (j-l). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Panel izquierdo, imágenes representativas. Barra, 10 μ M. Panel derecho, cuantificación de la fluorescencia. Para ZO-2, Cl-1 y Cl-2 se cuantificaron 20 canalículos por condición, provenientes de tres experimentos independientes. UA, unidades arbitrarias. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$; ns, no significativo. Para YAP, se cuantificaron 100 núcleos por condición derivados de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

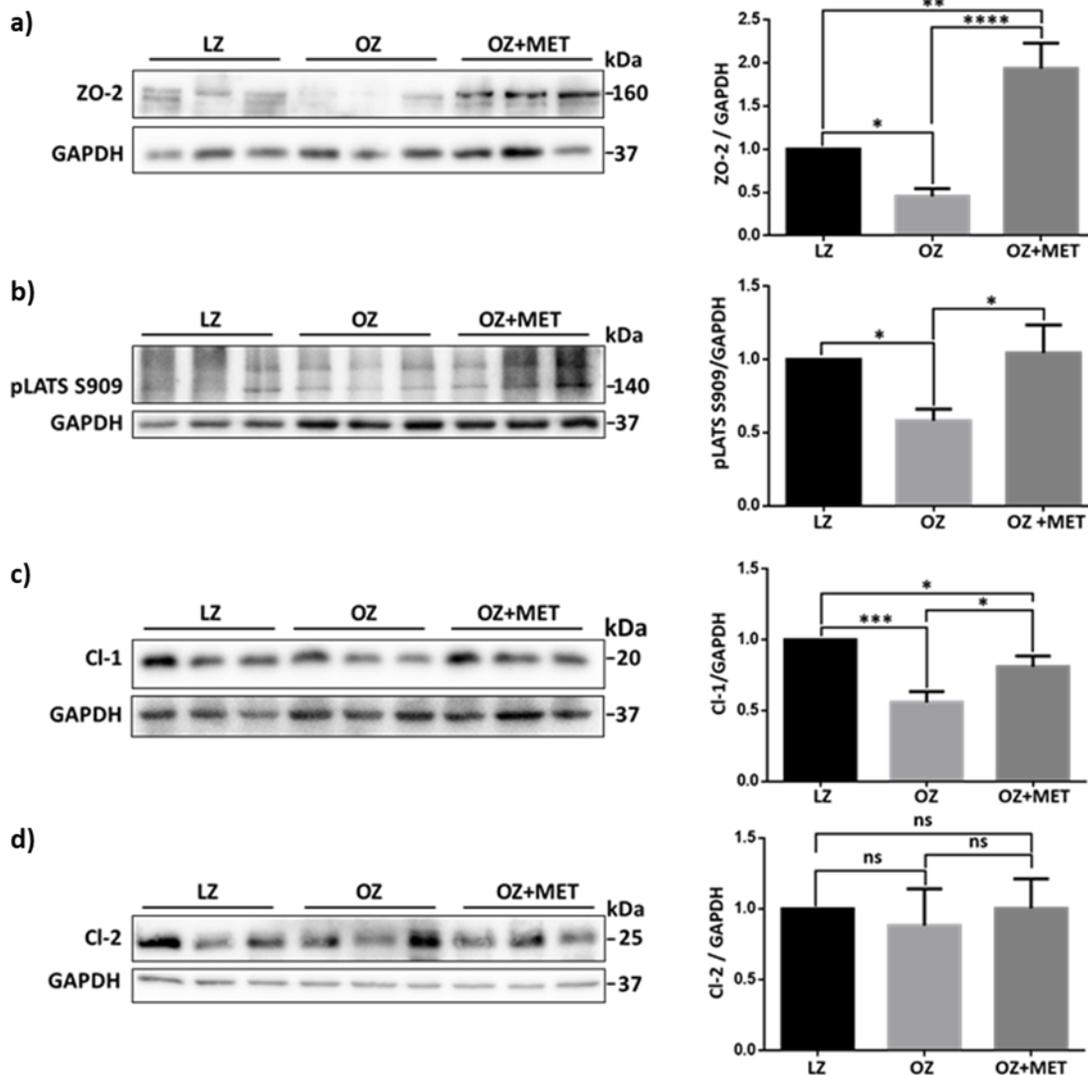


Figura 31. En las ratas OZ el tratamiento con metformina restaura en el hígado la expresión de ZO-2 y claudina-1 y promueve la activación de la cinasa LATS. Paneles izquierdos, Western blots representativos de ZO-2 (a), pLATS S909 (b) y claudinas -1(c) y -2 (d) en lisados de hígado de ratas LZ y OZ tratadas o no con metformina. Se utilizó GAPDH como control de carga. Se utilizaron 6 ratas por condición experimental y se analizaron al menos dos blots por cada rata. Paneles derechos, análisis cuantitativo. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los datos de las ratas LZ se normalizaron a 1. Los análisis estadísticos se realizaron con Anova de dos vías, seguida de pruebas de Fisher LSD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

Los animales y pacientes con esteatosis hepática (Dasarathy et al., 2011; Kalhan et al., 2011), así como los niños con CIFP-4 (Sambrotta et al., 2014) presentan un alto nivel de

ácidos biliares en el plasma. Por ello, analizamos si el tratamiento con metformina de las ratas OZ que aumenta la expresión de ZO-2 en el hígado, reduce la cantidad de sales biliares en el suero. En la figura 32 se muestra que la cantidad de sales biliares en el suero aumenta en las ratas OZ en comparación con las ratas LZ, y que este valor disminuye después del tratamiento con metformina. Este resultado sugiere que en las ratas OZ, la fuga de los ácidos biliares a través del espacio paracelular hacia el parénquima hepático y el suero, podría ser una consecuencia del silenciamiento de ZO-2 que compromete la función de la BBiB.

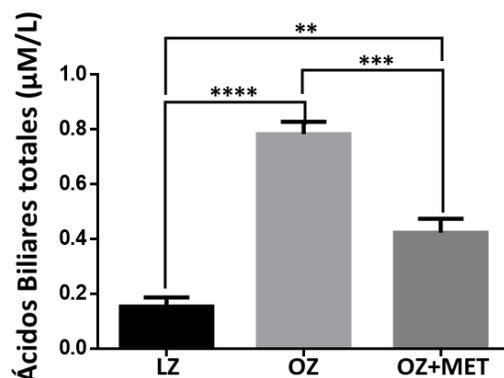


Figura 32. En las ratas OZ tratadas con metformina disminuye la concentración de ácidos biliares en el suero. Cuantificación de ácidos biliares totales en el suero de las ratas LZ y OZ tratadas o no con metformina. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba Anova de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Para medir la permeabilidad de los hepatocitos, evaluamos por microscopía electrónica la penetración a través de la UE del lantano, un marcador paracelular electrodenso. En la figura 33 se muestra que en el hígado de las ratas LZ no hay acumulación de lantano en la luz del canalículo. Sin embargo, en el hígado de las ratas OZ la luz del canalículo muestra una intensa tinción de lantano, mientras que en el hígado de las ratas OZ tratadas con metformina, el área de la UE que limita la luz del canalículo muestra una acumulación conspicua de lantano. Además, se observa infiltración de lantano en la luz del canalículo, aunque con menos intensidad que en el hígado de las ratas OZ.

En conjunto estos resultados indican que el tratamiento de las ratas OZ con metformina aumenta la expresión de ZO-2 y claudina-1 en las UEs de los hepatocitos y que esto restaura parcialmente la función de la BBiB.

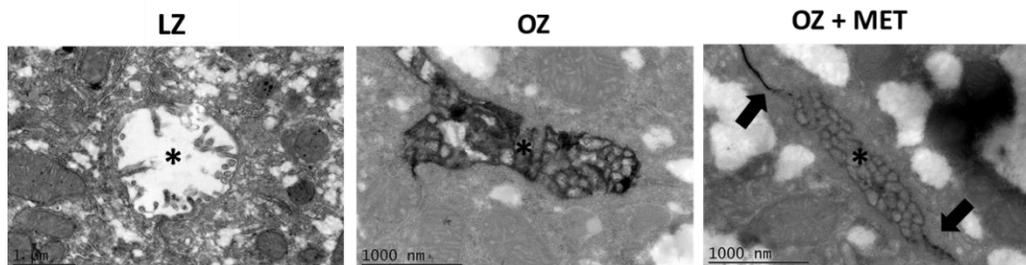


Figura 33. En las ratas OZ tratadas con metformina disminuye permeabilidad al lantano. Imágenes representativas de la penetración del lantano en el lumen de los canalículos biliares. En las ratas LZ no hay acumulación de lantano en el lumen del canalículo (asterisco). En las ratas OZ, se observa una tinción intensa de lantano en la luz del canalículo (asterisco). En las ratas OZ tratadas con metformina se observa la acumulación de lantano en el área de las UEs que limitan el lumen del canalículo (flechas), y una discreta infiltración de lantano al interior del canalículo (asterisco).

6.8) El tratamiento con metformina revierte la disfunción de la BBiB a través de la inhibición de JNK.

La cinasa activada por estrés c-JUN (JNK) provoca el desensamble de las UEs que induce la ausencia de calcio extracelular (Naydenov et al., 2009). Así mismo, la inhibición de JNK atenúa la ruptura de la barrera intestinal inducida por dextran sulfato de sodio (DSS) (Samak et al., 2015). Por otro lado, se ha visto que la activación de AMPK α 1 por metformina inhibe la señalización de JNK y en consecuencia bloquea la disfunción de la barrera intestinal (Deng et al., 2018). Con estos antecedentes, enseguida analizamos si en las ratas OZ tratadas con metformina disminuye el contenido de JNK activa. En la figura 34 se muestra que en el hígado de las ratas OZ sube la fosforilación de JNK en comparación con las ratas LZ pero disminuye después del tratamiento con metformina. Estos resultados sugieren que la metformina al inhibir la señalización de JNK, previene el silenciamiento de ZO-2 y la disfunción de la barrera BBiB.

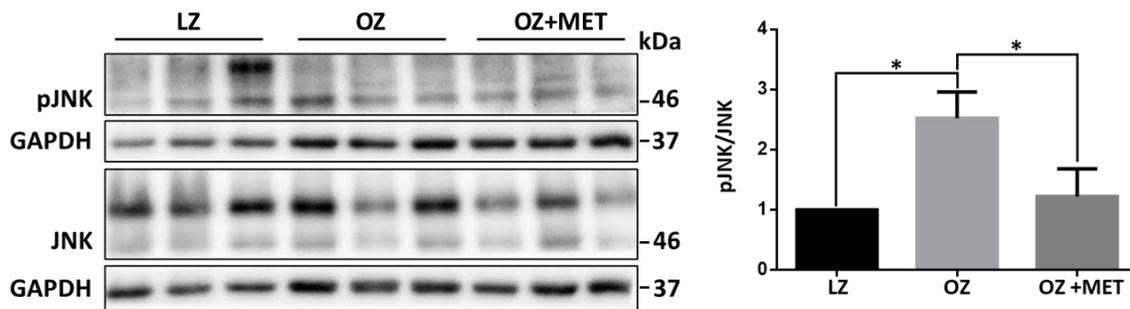


Figura 34. El tratamiento con metformina inhibe la activación de JNK. Western blot de pJNK y JNK. Se empleó GAPDH como control de carga. Se utilizaron 6 ratas por condición experimental y se analizaron al menos dos blots por cada rata. Panel izquierdo, Western blot representativo; panel derecho, análisis cuantitativo. Cada barra muestra el promedio \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Los datos de las ratas LZ se normalizaron a 1. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía, seguida de la prueba Fisher LSD; * $p < 0.05$.

En resumen, nuestros resultados indican que (Fig. 35): 1) en los tres modelos de hipertrofia estudiados: células MDCK ZO-2 KD, HRC en ratas y el hígado con esteatosis de la rata OZ, el silenciamiento de ZO-2 se acompaña de una reducción en la actividad de LATS y la acumulación nuclear de YAP, el efector final de la vía Hippo. 2) ZO-2 participa en la señalización de la vía Hippo debido a su interacción con LATS1. 3) El silenciamiento de ZO-2 en los riñones hipertróficos y el hígado con esteatosis se debe a la disminución del factor de transcripción Sp1 que es crítico para la transcripción del ARNm de ZO-2. 4) En las ratas OZ, la activación de la AMPK con metformina restaura la expresión de ZO-2 y claudina-1 en el hígado, reduce la permeabilidad celular y la concentración de ácidos biliares en el suero. Este proceso involucra la inhibición de la señalización de JNK que desencadena el desensamble de la unión.

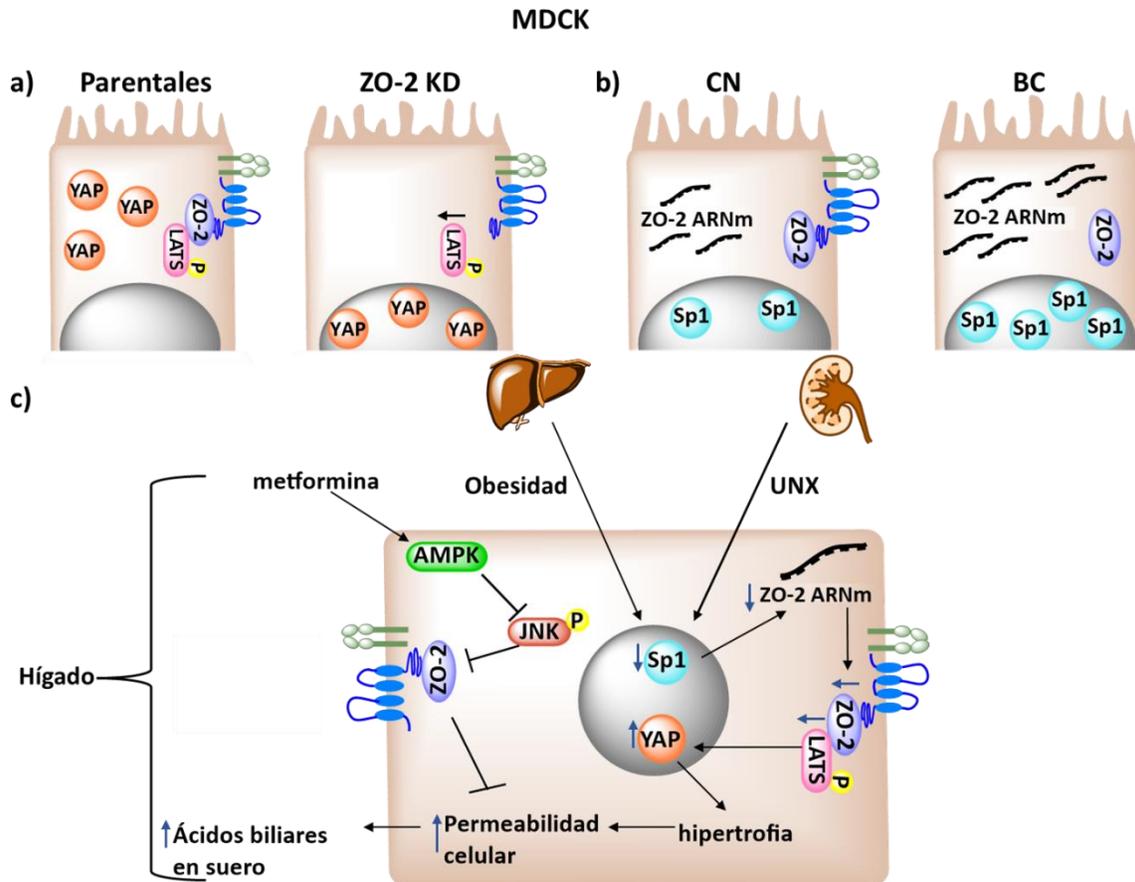


Figura 35. El silenciamiento de ZO-2 disminuye la activación de LATS, favoreciendo la concentración nuclear de YAP y el desarrollo de la hipertrofia. a) ZO-2 funciona como una proteína plataforma en las UEs que facilita la fosforilación de LATS e inhibe la acumulación nuclear de YAP. b) En los cultivos confluentes de células MDCK incubadas en medio con bajo calcio (BC), las UEs no se forman, pero el factor de transcripción Sp1 y el ARNm de ZO-2 se acumulan. c) En el riñón hipertrófico y el hígado con esteatosis, el silenciamiento de ZO-2 se genera por una menor transcripción de ZO-2, probablemente asociada a la disminución nuclear del factor de transcripción Sp1. ZO-2 interactúa con LATS y al disminuir la expresión de ZO-2 se bloquea la fosforilación y activación de LATS lo que facilita la acumulación nuclear de YAP. En el hígado con esteatosis esta condición promueve el incremento de la permeabilidad paracelular de los hepatocitos y la presencia de ácidos biliares en el suero. La metformina a través de la activación de la AMPK α 1 inhibe la señalización de JNK que promueve la disfunción de las UEs.

VII) Discusión

El silenciamiento de ZO-2 en las células MDCK reduce la fosforilación de YAP, la proteína blanco de la vía Hippo (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por ello, en esta tesis nos propusimos explorar la conexión entre ZO-2 y la vía Hippo. Nuestros resultados demuestran que ZO-2 y LATS1, la cinasa responsable de la fosforilación de YAP, co-inmunoprecipitan en las células MDCK. Además, mostramos que en los dos modelos de hipertrofia analizados: la HRC y la esteatosis hepática, el silenciamiento de ZO-2 se acompaña de una reducción de LATS activa y la concentración de YAP en el núcleo (Fig. 35). La interacción de ZO-2 con LATS1 facilita la fosforilación y localización de esta cinasa, ya que en las células ZO-2 KD la señal de fosfo LATS1 en el borde celular disminuye. Por lo tanto, pensamos que ZO-2 funciona como una plataforma que facilita la fosforilación y activación de LATS1, lo que permite la señalización a través de la vía Hippo que regula el tamaño celular.

Encontramos que ZO-2 no se asocia con MST1/2, la cinasa inmediata anterior a LATS1/2 en la cascada de señalización de la vía Hippo, o con su proteína plataforma SAV. Sin embargo, en el futuro sería importante averiguar si la interacción de LATS1 con MST1/2 o con las MAP4Ks, otra familia de cinasas que fosforilan a LATS1/2 (Meng et al., 2015), disminuye en ausencia de ZO-2.

Previamente demostramos que después de una UNX disminuye la expresión de ZO-2 en el riñón hipertrófico remanente (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por lo tanto, ahora exploramos si el silenciamiento de ZO-2 en la hipertrofia se regula a nivel transcripcional o traduccional. No encontramos evidencia de represión traduccional con los miRs-23a, -23b, -124 o -137 y en cambio, observamos una disminución en la cantidad del ARNm de ZO-2 en el riñón hipertrófico de rata. En humanos, la transcripción del ARNm de ZO-2 se regula por los promotores alternativos P_A y P_C que dan origen a las isoformas A y C de ZO-2 (Chlenski et al., 1999). Ambas isoformas se expresan en las células normales, pero solamente la última que carece de 23 aminoácidos en el extremo amino terminal se mantiene en las células pancreáticas cancerosas (Chlenski et al., 1999), sugiriendo que la isoforma ZO-2A podría ser crítica para la función de la UE en las células epiteliales no cancerosas. En el promotor P_A se

encuentran numerosos sitios Sp1 (Chlenski et al., 1999). Sp1 es un factor de transcripción que se expresa de manera ubicua y que funciona como activador transcripcional de una gran variedad de genes, incluyendo a los de mantenimiento, reguladores del ciclo celular y específicos de los tejidos [Para revisión ver (O'Connor et al., 2016)]. Aquí, analizamos la expresión del factor de transcripción Sp1 en el riñón hipertrófico y en las células MDCK. Nuestra observación de que disminuye la cantidad de este factor de transcripción en el riñón después de una UNX nos incitó a utilizar MTM en las células MDCK para estudiar el efecto de la inhibición de Sp1 en la expresión de ZO-2. Nuestros resultados revelaron que la MTM bloquea el incremento del ARNm de ZO-2 que ocurre cuando el cultivo de células MDCK se mantiene en la condición de BC, así como el incremento en la proteína ZO-2 que se observa después de que las células se transfieren de medio BC a CN. Estos resultados confirman que Sp1 regula la expresión de ZO-2 a nivel transcripcional y sugieren que en el riñón hipertrófico la disminución de Sp1 provoca el silenciamiento de ZO-2.

Por otra parte, el incremento del ARNm de ZO-2 que se observa en las células MDCK cultivadas en medio BC en comparación con las que se mantuvieron en CN, se asemeja al que se observó previamente con ZO-1 en las células MDCK (Gonzalez-Mariscal et al., 1999). Estos resultados nos hacen suponer que si las UEs no se establecen debido a la falta de calcio extracelular, las células acumulan ARNm de ZO-2 a modo de reserva para garantizar la futura síntesis de la proteína. Al respecto, ya se reportó una observación similar para el ARNm de ciclina D1 en las células MDCK, pues este mensajero aumenta en las células que no proliferan por estar incubadas con bajo suero (0.1 %), en comparación con las células que proliferan en un medio con 10% de suero (Tapia et al., 2009).

La hipertrofia se desarrolla a consecuencia de un desequilibrio entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas (Jurkovitz et al., 1992; Ling et al., 1996). En las células hipertróficas MDCK ZO-2 KD se observó que aumenta la actividad de la ruta mTOR y que esto sube la tasa de síntesis de proteínas (Dominguez-Calderon et al., 2016). En cambio, en el hígado de las ratas OZ disminuye la fosforilación de S6, lo que indica que la hipertrofia del hígado no se debe a la activación de mTOR. Además, encontramos que en el hígado de las ratas OZ disminuye la función de los autolisosomas en comparación con las ratas LZ, lo

que sugiere que una caída en la degradación es lo que favorece el desarrollo de la hipertrofia en el hígado. Estas observaciones concuerdan con un reporte que indica que en los cultivos primarios de hepatocitos fetales derivados de ratas ZDF con una frecuencia de 0.75 del gen *fa*, la síntesis de proteínas es significativamente menor que en cultivos con una frecuencia de 0.0 del gen *fa*, y con la observación de que el NH₄Cl inhibe la síntesis de proteínas en los cultivos con la frecuencia 0.0 del gen *fa* pero no en los cultivos con frecuencia 0.75 del gen *fa*, sugiriendo que los hepatocitos fetales que llevan el gen *fa* tienen errores genéticos en la función lisosomal (Goldstein et al., 1981). Este defecto genético que disminuye la degradación en los lisosomas podría ser crucial para el desarrollo de la hipertrofia en los hepatocitos y relacionarse con la observación de que los tratamientos que restringen la ingesta de alimento en las ratas OZ, provocan una disminución del peso, pero no normalizan la composición obesa de los animales que es de un 50% de lípidos en comparación a menos del 20% en las ratas delgadas (Cleary et al., 1980).

Otro mecanismo que podría disparar la hipertrofia de los hepatocitos en las ratas OZ se basa en el incremento de p21, el inhibidor de cinasas dependiente de ciclina. En los hígados con esteatosis esta alteración inhibe la división celular (Donthamsetty et al., 2007) y facilita el desarrollo de un fenotipo hipertrófico.

Tanto en el hígado de las ratas OZ, como en el riñón remanente de la rata uninefrectomizada la hipertrofia induce el silenciamiento de ZO-2 (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por ello, concluimos que independientemente del mecanismo que genere la hipertrofia, este estado involucra el silenciamiento de ZO-2.

En las células MDCK que carecen de ZO-2, la transfección de ZO-2 permite a las células recuperar su tamaño normal (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por eso, ahora empleamos metformina como estrategia para inducir la re-expresión de ZO-2 en el hígado de las ratas OZ. La metformina es un derivado de la guanidina, el ingrediente activo de *G. officinalis* también conocida lila francesa, que en la época medieval se usaba para tratar la diabetes. En las ratas OZ, el tratamiento con metformina mitiga la esteatosis hepática y disminuye la concentración de triacilglicerol (TAG) en el plasma a las 21 semanas de tratamiento. En cambio, no modifica la ingesta ni el gasto energético, la evolución de la diabetes o la

expresión en el hígado de genes del metabolismo de los ácidos grasos (Forcheron et al., 2009).

La metformina (Zhou et al., 2001), el AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside) y la cinasa LKB1 (el ortólogo de PAR4 en *C. elegans* and *D. melanogaster*) activan a la cinasa de serina/treonina AMPK de diferentes maneras. La metformina emplea un mecanismo independiente de los nucleótidos de adenina (Hawley et al., 2002) que en los hepatocitos incrementa la fosforilación de la subunidad α catalítica de la AMPK en la Thr-172 (Zang et al., 2004). En cambio, el AICAR es un nucleósido que se convierte en el nucleótido ZMP, que mimetiza el efecto del AMP en la AMPK (Corton et al., 1995) (Henin et al., 1995). La LKB1 fosforila a la Thr -172 y de esta manera activa a la AMPK (Hawley et al., 2003; Hong et al., 2003).

La AMPK es un sensor de la energía celular que se activa durante el estrés metabólico generado por la hipoxia, la isquemia, la privación de glucosa o con el ejercicio (Hardie et al., 2003) (Coven et al., 2003). La activación de la AMPK con la LKB1, el AICAR o la metformina favorece la aparición de las proteínas de la UE. Así, la activación de LKB1 induce la polarización de las células epiteliales intestinales individuales y la redistribución de la proteína de la UE ZO-1 en un círculo de puntos periférico al borde en cepillo (Baas et al., 2004). La activación de la AMPK con AICAR facilita el ensamble de la UE bajo la condición de Ca^{2+} extracelular normal, protege parcialmente del desensamble de las UEs inducido por la depleción de Ca^{2+} , e incluso inicia el ensamble de la UE en ausencia de Ca^{2+} (Zhang et al., 2006) (Zheng and Cantley, 2007). Además, la activación de la AMPK con AICAR dispara la relocalización de ZO-2 del citoplasma al borde de las células MDCK cultivadas en la condición de bajo calcio (1-5 μ M) (Amaya et al., 2019). La metformina restaura el ensamble de la UE en el epitelio intestinal y protege contra la disfunción de la barrera intestinal en la colitis experimental inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) y en pacientes con colitis ulcerativa (Deng et al., 2018) (Chen et al., 2018). Estas observaciones, concuerdan con nuestros resultados que muestran que el tratamiento de las ratas OZ con metformina aumenta la expresión de ZO-2 y claudina-1 en el hígado y reduce el contenido de ácidos biliares en el suero y la permeabilidad de las UEs en los hepatocitos.

El mecanismo por el cual la activación de AMPK por metformina incrementa la expresión de ZO-2 en el hígado de la rata OZ involucra la inhibición de JNK, ya que en las ratas OZ la metformina disminuye la fosforilación de JNK. Estos resultados concuerdan con observaciones en células Caco-2 donde la activación de AMPK α 1, por metformina suprime la activación de JNK inducida por DSS y aumenta la expresión de ZO-1 y ocludina (Deng et al., 2018).

El haber encontrado que ZO-2 disminuye en el hígado con esteatosis, que su expresión se restaura con metformina y que esto se acompaña de una disminución en el contenido de ácidos biliares en suero, nos sugiere que ZO-2 podría ser un blanco terapéutico para condiciones del hígado donde se compromete el sellado de la UE. En este sentido es destacable el caso de la colestasis intrahepática del embarazo (ICP).

Ya que las pacientes con ICP solo manifiestan el fenotipo colestático cuando están embarazadas, típicamente durante el tercer trimestre, cuando han ganado más peso. Además, llama la atención la coexistencia de ICP con el hígado graso agudo del embarazo (English and Rao, 2015; Vanjak et al., 1991). Nuestros resultados muestran que en el hígado hipertrófico disminuye la expresión de ZO-2, lo que sugiere especulativamente que en las mujeres embarazadas con hígado graso, la disminución de ZO-2 podría facilitar el desarrollo de la colestasis si la mujer además alberga una mutación heterocigota en los genes relacionados con la colestasis intrahepática.

En resumen, nuestros resultados demuestran que ZO-2 interactúa con LATS1 y promueve su activación, mientras que el silenciamiento de ZO-2 en hígado y riñón con hipertrofia disminuye la fosforilación de LATS y provoca la acumulación nuclear de YAP. Estos resultados revelan que ZO-2 es un regulador de la vía Hippo y explican por qué el silenciamiento de ZO-2 en las células MDCK aumenta la talla celular (Dominguez-Calderon et al., 2016). Las observaciones hechas en el hígado hipertrófico resaltan la importancia de la activación de la cinasa AMPK, la inhibición de la cinasa JNK y de la proteína de la UE ZO-2 para mantener y restaurar la BBiB y nos sugieren que estas proteínas son posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la colestasis intrahepática.

VIII) Bibliografía

Aleman, V., Osorio, B., Chavez, O., Rendon, A., Mornet, D., and Martinez, D. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol* *115*, 243-254.

Amaya, E., Alarcon, L., Martin-Tapia, D., Cuellar-Perez, F., Cano-Cortina, M., Ortega-Olvera, J.M., Cisneros, B., Rodriguez, A.J., Gamba, G., and Gonzalez-Mariscal, L. (2019). Activation of the Ca(2+) sensing receptor and the PKC/WNK4 downstream signaling cascade induces incorporation of ZO-2 to tight junctions and its separation from 14-3-3. *Mol Biol Cell*, mbcE18090591.

Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* *116*, 457-466.

Bae, S.J., Ni, L., Osinski, A., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., and Luo, X. (2017). SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK. *Elife* *6*.

Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J. (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* *11*, 11-23.

Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and González-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental Cell Research* *292*, 51-66.

Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N.A., Snyder, S.H., and Sabatini, D.M. (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 1432-1437.

Cai, J., Maitra, A., Anders, R.A., Taketo, M.M., and Pan, D. (2015). beta-Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis. *Genes Dev* *29*, 1493-1506.

Carlton, V.E., Harris, B.Z., Puffenberger, E.G., Batta, A.K., Knisely, A.S., Robinson, D.L., Strauss, K.A., Shneider, B.L., Lim, W.A., Salen, G., *et al.* (2003). Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet* *34*, 91-96.

Chamorro, D., Alarcon, L., Ponce, A., Tapia, R., Gonzalez-Aguilar, H., Robles-Flores, M., Mejia-Castillo, T., Segovia, J., Bandala, Y., Juaristi, E., *et al.* (2009). Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Molecular biology of the cell* *20*, 4120-4129.

Chan, E.H., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R.B., Schafer, A., Nigg, E.A., and Sillje, H.H. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24, 2076-2086.

Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., Dreazen, A., Cagnard, N., Carpentier, W., Kiss, T., Meyuhos, O., *et al.* (2014). Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* 33, 474-483.

Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., *et al.* (2005a). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 33, e179.

Chen, J.K., Chen, J., Neilson, E.G., and Harris, R.C. (2005b). Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 16, 1384-1391.

Chen, J.K., Chen, J., Thomas, G., Kozma, S.C., and Harris, R.C. (2009). S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F585-593.

Chen, L., Wang, J., You, Q., He, S., Meng, Q., Gao, J., Wu, X., Shen, Y., Sun, Y., Wu, X., *et al.* (2018). Activating AMPK to Restore Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelium and to Attenuate Experimental Colitis by Metformin. *Front Pharmacol* 9, 761.

Chen, Q., Zhang, N., Xie, R., Wang, W., Cai, J., Choi, K.S., David, K.K., Huang, B., Yabuta, N., Nojima, H., *et al.* (2015). Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP. *Genes Dev* 29, 1285-1297.

Chlenski, A., Ketels, K.V., Engeriser, J.L., Talamonti, M.S., Tsao, M.S., Koutnikova, H., Oyasu, R., and Scarpelli, D.G. (1999). z0-2 gene alternative promoters in normal and neoplastic human pancreatic duct cells. *Int J Cancer* 83, 349-358.

Claude, P., and Goodenough, D.A. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58, 390-400.

Cleary, M.P., Vasselli, J.R., and Greenwood, M.R. (1980). Development of obesity in Zucker obese (fafa) rat in absence of hyperphagia. *The American journal of physiology* 238, E284-292.

Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229, 558-565.

Couzens, A.L., Knight, J.D., Kean, M.J., Teo, G., Weiss, A., Dunham, W.H., Lin, Z.Y., Bagshaw, R.D., Sicheri, F., Pawson, T., *et al.* (2013). Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal* 6, rs15.

Coven, D.L., Hu, X., Cong, L., Bergeron, R., Shulman, G.I., Hardie, D.G., and Young, L.H. (2003). Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E629-636.

Dasarathy, S., Yang, Y., McCullough, A.J., Marczewski, S., Bennett, C., and Kalhan, S.C. (2011). Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23, 382-388.

Deng, J., Zeng, L., Lai, X., Li, J., Liu, L., Lin, Q., and Chen, Y. (2018). Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation. *J Cell Mol Med* 22, 546-557.

Dixon, P.H., Sambrotta, M., Chambers, J., Taylor-Harris, P., Syngelaki, A., Nicolaides, K., Knisely, A.S., Thompson, R.J., and Williamson, C. (2017). An expanded role for heterozygous mutations of ABCB4, ABCB11, ATP8B1, ABCC2 and TJP2 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Sci Rep* 7, 11823.

Dominguez-Calderon, A., Avila-Flores, A., Ponce, A., Lopez-Bayghen, E., Calderon-Salinas, J.V., Luis Reyes, J., Chavez-Munguia, B., Segovia, J., Angulo, C., Ramirez, L., *et al.* (2016). ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Molecular biology of the cell* 27, 1581-1595.

Donthamsetty, S., Bhave, V.S., Mitra, M.S., Latendresse, J.R., and Mehendale, H.M. (2007). Nonalcoholic fatty liver sensitizes rats to carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Hepatology* 45, 391-403.

Dragsten, P.R., Blumenthal, R., and Handler, J.S. (1981). Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294, 718-722.

English, N., and Rao, J. (2015). Acute fatty liver of pregnancy with hypoglycaemia, diabetes insipidus and pancreatitis, preceded by intrahepatic cholestasis of pregnancy. *BMJ Case Rep* 2015.

Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., *et al.* (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7, 727-736.

Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 113-120.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.

Feng, T., Shao, F., Wu, Q., Zhang, X., Xu, D., Qian, K., Xie, Y., Wang, S., Xu, N., Wang, Y., *et al.* (2016). miR-124 downregulation leads to breast cancer progression via LncRNA-MALAT1 regulation and CDK4/E2F1 signal activation. *Oncotarget* 7, 16205-16216.

Forcheron, F., Abdallah, P., Basset, A., del Carmine, P., Haffar, G., and Beylot, M. (2009). Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity (Silver Spring)* *17*, 1381-1389.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* *141*, 1539-1550.

Gallego-Gutierrez, H., Gonzalez-Gonzalez, L., Ramirez-Martinez, L., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2021). Tight junction protein ZO-2 modulates the nuclear accumulation of transcription factor TEAD. *Molecular biology of the cell* *32*, 1347-1358.

Gao, X.R., Wang, H.P., Zhang, S.L., Wang, M.X., and Zhu, Z.S. (2015). Pri-miR-124 rs531564 polymorphism and colorectal cancer risk. *Scientific reports* *5*, 14818.

Ge, T., Zhang, X., Xiao, Y., Wang, Y., and Zhang, T. (2019). Novel compound heterozygote mutations of TJP2 in a Chinese child with progressive cholestatic liver disease. *BMC Med Genet* *20*, 18.

Gebert, L.F.R., and MacRae, I.J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 21-37.

Goldstein, A.L., Palmer, J.E., and Johnson, P.R. (1981). Primary cultures of fetal hepatocytes from the genetically obese Zucker rat: protein synthesis. *In Vitro* *17*, 651-655.

González-Mariscal, L., Bautista, P., Díaz-Coránguez, M., and Quirós, M. (2012). Tight Junctions.

Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., and Cerejido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* *86*, 113-125.

Gonzalez-Mariscal, L., Islas, S., Contreras, R.G., Garcia-Villegas, M.R., Betanzos, A., Vega, J., Diaz-Quinonez, A., Martin-Orozco, N., Ortiz-Navarrete, V., Cerejido, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells. *Exp Cell Res* *248*, 97-109.

Gonzalez-Mariscal, L., Miranda, J., Ortega-Olvera, J.M., Gallego-Gutierrez, H., Raya-Sandino, A., and Vargas-Sierra, O. (2016). Zonula Occludens Proteins in Cancer. *Current Pathobiology Reports* *4*, 107-116.

Gonzalez-Mariscal, L., Miranda, J., Raya-Sandino, A., Dominguez-Calderon, A., and Cuellar-Perez, F. (2017). ZO-2, a tight junction protein involved in gene expression, proliferation, apoptosis, and cell size regulation. *Ann N Y Acad Sci* *1397*, 35-53.

Gonzalez-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcon, L., and Jaramillo, B.E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp Cell Res* *312*, 3323-3335.

Gonzalez-Torres, A., Banuelos-Villegas, E.G., Martinez-Acuna, N., Sulpice, E., Gidrol, X., and Alvarez-Salas, L.M. (2018). MYPT1 is targeted by miR-145 inhibiting viability, migration and invasion in 2D and 3D HeLa cultures. *Biochemical and biophysical research communications* 507, 348-354.

Gordo-Gilart, R., Andueza, S., Hierro, L., Martinez-Fernandez, P., D'Agostino, D., Jara, P., and Alvarez, L. (2015). Functional analysis of ABCB4 mutations relates clinical outcomes of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 to the degree of MDR3 floppase activity. *Gut* 64, 147-155.

Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 36, D154-158.

Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3460-3464.

Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9-22.

Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A., and Hudson, E.R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546, 113-120.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Makela, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2, 28.

Hawley, S.A., Gadalla, A.E., Olsen, G.S., and Hardie, D.G. (2002). The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 51, 2420-2425.

Henin, N., Vincent, M.F., Gruber, H.E., and Van den Berghe, G. (1995). Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 9, 541-546.

Hernandez-Guzman, C., Gallego-Gutierrez, H., Chavez-Munguia, B., Martin-Tapia, D., and Gonzalez-Mariscal, L. (2021). Zonula occludens 2 and Cell-Cell Contacts Are Required for Normal Nuclear Shape in Epithelia. *Cells* 10.

Ho, L., Kulaberoglu, Y., Gundogdu, R., Cook, D., Mavis, M., Gomez, M., Gomez, V., and Hergovich, A. (2016). The characterisation of LATS2 kinase regulation in Hippo-YAP signalling. *Cell Signal* 28, 488-497.

Hong, E.A., Gautrey, H.L., Elliott, D.J., and Tyson-Capper, A.J. (2012). SAFB1- and SAFB2-mediated transcriptional repression: relevance to cancer. *Biochem Soc Trans* 40, 826-830.

Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8839-8843.

Huang, H.Y., Li, R., Sun, Q., Wang, J., Zhou, P., Han, H., and Zhang, W.H. (2002). [LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3]. *Yi Chuan Xue Bao* *29*, 953-958.

Huerta, M., Munoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramirez, L., Recillas-Targa, F., Gonzalez-Mariscal, L., and Lopez-Bayghen, E. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Molecular biology of the cell* *18*, 4826-4836.

Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M., and Shima, K. (1996). Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun* *224*, 597-604.

Islas, S., Vega, J., Ponce, L., and Gonzalez-Mariscal, L. (2002). Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* *274*, 138-148.

Itoh, M., Terada, M., and Sugimoto, H. (2021). The zonula occludens protein family regulates the hepatic barrier system in the murine liver. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1867*, 165994.

Jaquotot-Herranz, M., Casanova-Martinez, L., Oliveira-Martin, A., Castillo-Grau, P., Alvarez-Garcia, L., Jara-Vega, P., and Gea-Rodriguez, F. (2013). Clinical variability of mutations in the ABCB11 gene: a case report. *Rev Esp Enferm Dig* *105*, 52-54.

Jaramillo, B.E., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res* *297*, 247-258.

Jurkovitz, C.T., England, B.K., Ebb, R.G., and Mitch, W.E. (1992). Influence of ammonia and pH on protein and amino acid metabolism in LLC-PK1 cells. *Kidney Int* *42*, 595-601.

Kalhan, S.C., Guo, L., Edmison, J., Dasarathy, S., McCullough, A.J., Hanson, R.W., and Milburn, M. (2011). Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* *60*, 404-413.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., *et al.* (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular biology of the cell* *19*, 2465-2475.

Kava, R., Greenwood, M.R.C., and Johnson, P.R. (1990). Zucker (fa/fa) Rat. *ILAR Journal* *32*, 4-8.

Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., and Mantzoros, C.S. (2010). Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med* 152, 93-100.

Kloek, J.J., Marechal, X., Roelofsen, J., Houtkooper, R.H., van Kuilenburg, A.B., Kulik, W., Bezemer, R., Neviere, R., van Gulik, T.M., and Heger, M. (2012). Cholestasis is associated with hepatic microvascular dysfunction and aberrant energy metabolism before and during ischemia-reperfusion. *Antioxid Redox Signal* 17, 1109-1123.

Kojima, T., Yamamoto, T., Murata, M., Chiba, H., Kokai, Y., and Sawada, N. (2003). Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med Electron Microsc* 36, 157-164.

Kramer, M.F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 15*, Unit 15 10.

Lam, P., Soroka, C.J., and Boyer, J.L. (2010). The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* 30, 125-133.

Lechuga, S., Alarcon, L., Solano, J., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2010). Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Exp Cell Res* 316, 3124-3139.

Li, J., Zhao, Y., Lu, Y., Ritchie, W., Grau, G., Vadas, M.A., and Gamble, J.R. (2016). The Polycistronic miR-23-27-24 Complexes Target Endothelial Cell Junctions: Differential Functional and Molecular Effects of miR-23a and miR-23b. *Molecular therapy Nucleic acids* 5, e354.

Ling, H., Vamvakas, S., Gekle, M., Schaefer, L., Teschner, M., Schaefer, R.M., and Heidland, A. (1996). Role of lysosomal cathepsin activities in cell hypertrophy induced by NH₄Cl in cultured renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 7, 73-80.

Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., *et al.* (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF^{beta}-TrCP E3 ligase. *J Biol Chem* 285, 37159-37169.

Liu, G.Y., and Sabatini, D.M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 183-203.

Lloyd, A.C. (2013). The regulation of cell size. *Cell* 154, 1194-1205.

Lora, L., Mazzon, E., Martines, D., Fries, W., Muraca, M., Martin, A., d'Odorico, A., Naccarato, R., and Citi, S. (1997). Hepatocyte tight-junctional permeability is increased in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 113, 1347-1354.

Martin, I.V., Schmitt, J., Minkenberg, A., Mertens, J.C., Stieger, B., Mullhaupt, B., and Geier, A. (2010). Bile acid retention and activation of endogenous hepatic farnesoid-X-receptor in the pathogenesis of fatty liver disease in ob/ob-mice. *Biol Chem* 391, 1441-1449.

Martinez-Palomo, A., Meza, I., Beaty, G., and Cereijido, M. (1980). Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 87, 736-745.

Matsumoto, K., Imasato, M., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Watanabe, M., Eguchi, H., Nagano, H., Hikita, H., Tatsumi, T., Takehara, T., *et al.* (2014). Claudin 2 deficiency reduces bile flow and increases susceptibility to cholesterol gallstone disease in mice. *Gastroenterology* 147, 1134-1145 e1110.

Matteoni, C.A., Younossi, Z.M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y.C., and McCullough, A.J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116, 1413-1419.

McCormack, L., Dutkowski, P., El-Badry, A.M., and Clavien, P.A. (2011). Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol* 54, 1055-1062.

Meerschaert, K., Tun, M.P., Remue, E., De Ganck, A., Boucherie, C., Vanloo, B., Degeest, G., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., Bhardwaj, N., *et al.* (2009). The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cell Mol Life Sci* 66, 3951-3966.

Meng, Z., Moroishi, T., Mottier-Pavie, V., Plouffe, S.W., Hansen, C.G., Hong, A.W., Park, H.W., Mo, J.S., Lu, W., Lu, S., *et al.* (2015). MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun* 6, 8357.

Mo, J.S., Park, H.W., and Guan, K.L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep* 15, 642-656.

Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1999). *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285, 2126-2129.

Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 511-516.

Moroishi, T., Park, H.W., Qin, B., Chen, Q., Meng, Z., Plouffe, S.W., Taniguchi, K., Yu, F.X., Karin, M., Pan, D., *et al.* (2015). A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev* 29, 1271-1284.

Naydenov, N.G., Hopkins, A.M., and Ivanov, A.I. (2009). c-Jun N-terminal kinase mediates disassembly of apical junctions in model intestinal epithelia. *Cell Cycle* 8, 2110-2121.

O'Connor, L., Gilmour, J., and Bonifer, C. (2016). The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease. *Yale J Biol Med* 89, 513-525.

Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7, 286-294.

Parsons, D.W., Roy, A., Yang, Y., Wang, T., Scollon, S., Bergstrom, K., Kerstein, R.A., Gutierrez, S., Petersen, A.K., Bavle, A., *et al.* (2016). Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors. *JAMA Oncol* 2, 616-624.

Paulusma, C.C., Elferink, R.P., and Jansen, P.L. (2010). Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Semin Liver Dis* 30, 117-124.

Petrov, A., Tsa, A., and Puglisi, J.D. (2013). Analysis of RNA by analytical polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in enzymology* 530, 301-313.

Pizarro, M., Balasubramaniyan, N., Solis, N., Solar, A., Duarte, I., Miquel, J.F., Suchy, F.J., Trauner, M., Accatino, L., Ananthanarayanan, M., *et al.* (2004). Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function. *Gut* 53, 1837-1843.

Quiros, M., Alarcon, L., Ponce, A., Giannakouros, T., and Gonzalez-Mariscal, L. (2013). The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Molecular biology of the cell* 24, 2528-2543.

Rahner, C., Mitic, L.L., and Anderson, J.M. (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120, 411-422.

Roehlen, N., Roca Suarez, A.A., El Saghire, H., Saviano, A., Schuster, C., Lupberger, J., and Baumert, T.F. (2020). Tight Junction Proteins and the Biology of Hepatobiliary Disease. *Int J Mol Sci* 21.

Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., and Klionsky, D.J. (2009). In search of an "autophagometer". *Autophagy* 5, 585-589.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhis, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 19, 2199-2211.

Samak, G., Chaudhry, K.K., Gangwar, R., Narayanan, D., Jaggar, J.H., and Rao, R. (2015). Calcium/Ask1/MKK7/JNK2/c-Src signalling cascade mediates disruption of intestinal epithelial tight junctions by dextran sulfate sodium. *Biochem J* 465, 503-515.

Sambrotta, M., Strautnieks, S., Papouli, E., Rushton, P., Clark, B.E., Parry, D.A., Logan, C.V., Newbury, L.J., Kamath, B.M., Ling, S., *et al.* (2014). Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet* 46, 326-328.

Sambrotta, M., and Thompson, R.J. (2015). Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease. *Tissue Barriers* 3, e1026537.

Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., and Kozma, S.C. (1998). Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J* 17, 6649-6659.

Sleiman, S.F., Langley, B.C., Basso, M., Berlin, J., Xia, L., Payappilly, J.B., Kharel, M.K., Guo, H., Marsh, J.L., Thompson, L.M., *et al.* (2011). Mithramycin is a gene-selective Sp1 inhibitor that identifies a biological intersection between cancer and neurodegeneration. *J Neurosci* 31, 6858-6870.

Stevenson, B.R., Anderson, J.M., and Bullivant, S. (1988). The epithelial tight junction: structure, function and preliminary biochemical characterization. *Mol Cell Biochem* 83, 129-145.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103, 755-766.

Tanaka, N., Matsubara, T., Krausz, K.W., Patterson, A.D., and Gonzalez, F.J. (2012). Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 56, 118-129.

Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., and Gonzalez-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Molecular biology of the cell* 20, 1102-1117.

Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I.A., Weiger, T.M., Bauer, H.C., and Bauer, H. (2003). The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem* 278, 2692-2700.

Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R.C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F.D., and Guan, K.L. (2012). YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol* 14, 1322-1329.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126, 741-754.

van Meer, G., and Simons, K. (1986). The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J* 5, 1455-1464.

Vanjak, D., Moreau, R., Roche-Sicot, J., Soulier, A., and Sicot, C. (1991). Intrahepatic cholestasis of pregnancy and acute fatty liver of pregnancy. An unusual but favorable association? *Gastroenterology* 100, 1123-1125.

Vij, M., Shanmugam, N.P., Reddy, M.S., Sankaranarayanan, S., and Rela, M. (2017). Paediatric hepatocellular carcinoma in tight junction protein 2 (TJP2) deficiency. *Virchows Arch* 471, 679-683.

Wood, A.M., Livingston, E.G., Hughes, B.L., and Kuller, J.A. (2018). Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy: A Review of Diagnosis and Management. *Obstet Gynecol Surv* 73, 103-109.

Xu, J., Anuar, F., Ali, S.M., Ng, M.Y., Phua, D.C., and Hunziker, W. (2009). Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Molecular biology of the cell* 20, 4268-4277.

Xu, J., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Ali, S.M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol* 28, 1669-1678.

Xu, J., Kausalya, P.J., Van Hul, N., Caldez, M.J., Xu, S., Ong, A.G.M., Woo, W.L., Mohamed Ali, S., Kaldis, P., and Hunziker, W. (2021). Protective Functions of ZO-2/Tjp2 Expressed in Hepatocytes and Cholangiocytes Against Liver Injury and Cholestasis. *Gastroenterology* 160, 2103-2118.

Yang, S.Q., Lin, H.Z., Mandal, A.K., Huang, J., and Diehl, A.M. (2001). Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* 34, 694-706.

Yu, F.X., and Guan, K.L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev* 27, 355-371.

Yu, H., Xue, Y., Wang, P., Liu, X., Ma, J., Zheng, J., Li, Z., Li, Z., Cai, H., and Liu, Y. (2017). Knockdown of long non-coding RNA XIST increases blood-tumor barrier permeability and inhibits glioma angiogenesis by targeting miR-137. *Oncogenesis* 6, e303.

Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H., Brecher, P., Ruderman, N.B., and Cohen, R.A. (2004). AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering

effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry* *279*, 47898-47905.

Zeisel, M.B., Dhawan, P., and Baumert, T.F. (2018). Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut*.

Zhang, L., Li, J., Young, L.H., and Caplan, M.J. (2006). AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 17272-17277.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* *24*, 72-85.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., *et al.* (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* *21*, 2747-2761.

Zheng, B., and Cantley, L.C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 819-822.

Zheng, Y., and Pan, D. (2019). The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Dev Cell* *50*, 264-282.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., *et al.* (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* *108*, 1167-1174.

Zhou, S., Hertel, P.M., Finegold, M.J., Wang, L., Kerkar, N., Wang, J., Wong, L.J., Plon, S.E., Sambrotta, M., Foskett, P., *et al.* (2015). Hepatocellular carcinoma associated with tight-junction protein 2 deficiency. *Hepatology* *62*, 1914-1916.